

**Präklinische Testung nanopartikulärer Arzneistoffsysteme
auf Basis von humanem Serumalbumin
zum gezielten Wirkstofftransport**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Sylvia Wagner
aus St. Wendel

Frankfurt 2010
(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. D. Steinhilber
Gutachter:	Prof. Dr. J. Kreuter, Prof. Dr. H. v. Briesen
Datum der Disputation:	17.05.2010

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) in St. Ingbert in der Abteilung Zellbiologie und Angewandte Virologie unter Anleitung von PD Dr. Hagen von Briesen angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. G. R. Fuhr danke ich dafür die Arbeit am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik durchführen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. J. Kreuter danke ich für die Möglichkeit der externen Promotion unter seiner Begutachtung sowie für die Möglichkeit, unter seiner Anleitung im Rahmen eines BMBF-Projektes innerhalb einer multidisziplinären Arbeitsgemeinschaft auf dem Gebiet der Nanotechnologie mitarbeiten zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Hagen von Briesen, der die Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichte. Danken möchte ich auch für seine fortwährende Unterstützung in allen wissenschaftlichen und organisatorischen Belangen, die darüber hinaus durch seine stete Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft gekennzeichnet war.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei Judith Bungert und Sascha Wien für ihre Hilfe und technische Unterstützung bei der Laborarbeit.

Allen Mitarbeitern der Abteilung möchte ich für das gute Betriebsklima und der immer freundlichen Zusammenarbeit ganz herzlich danken.

Am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Westfälischen Wilhelms-Universität möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Langer für seine wissenschaftlichen Beiträge in zahlreichen Diskussionen danken.

Mein Dank gilt darüber hinaus Frau Dr. M. Anhorn, Frau A. Zensi und Herrn J. Kufleitner für die Herstellung der Nanopartikel-Präparationen und für die konstruktive

Zusammenarbeit, ohne die diese Arbeit in der entstandenen Form nicht möglich gewesen wäre.

Bei Frau Dr. A. Katsen-Globa aus der Abteilung Biophysik und Kryotechnologie am Fraunhofer-IBMT bedanke ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Raster-Elektronen-Mikroskopie.

Bei Herrn Daniel Sauer aus der Abteilung Biophysik und Kryotechnologie am Fraunhofer-IBMT bedanke ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft im Bereich der konfokalen Mikroskopie und der Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse.

Am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität möchte ich Prof. Dr. C. Pietrzik für das zur Verfügung stellen der LRP-Antikörper, der LRP-Rezeptor-Domänen und des RAP danken sowie für seine konstruktiven Diskussionen und Anmerkungen im Bereich der Blut-Hirn-Schranken-Mechanismen.

Am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr möchte ich PD Dr. F. Worek für das Überlassen des Obidoxims danken sowie für seine Hilfestellungen und Anregungen im Bereich der Organophosphat-Vergiftungen.

Der Firma Merck KGaA und Herrn Schwartz möchte ich für die Zusammenarbeit in einem gemeinsamen BMBF-Projekt und für die Bereitstellung der Melanom-Zellen und des Antikörpers DI17E6 danken.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Nanopartikuläre Arzneistoffsysteme	1
	Was sind nanopartikuläre Arzneistoffsysteme?	1
	Was können sie leisten?	3
1.2.	Nanopartikuläre Arzneistoffsysteme zur Tumorthherapie	4
1.2.1.	Drug-Targeting	4
1.2.1.1.	Monoklonale Antikörper als Liganden	5
	HER2/neu (ErbB2) als Target	6
	Trastuzumab als Ligand	6
	$\alpha_v\beta_3$ -Integrine als Target	8
	DI17E6 als Ligand	9
1.2.2.	Doxorubicin	9
1.3.	Nanopartikuläre Arzneistoffsysteme zur Überwindung biologischer Barrieren	10
1.3.1.	Die Blut-Hirn-Schranke	10
1.3.2.	Historische Entwicklung der Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke	12
1.3.2.1.	Apolipoprotein E als Ligand	13
	Die LDL-Rezeptor Familie	14
1.3.3.	Oxime als Antidote bei Organophosphat-Vergiftungen	16
2.	ZIELSETZUNG	18
3.	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1.	Nanopartikel zum spezifischen Tumor-Targeting	20
3.1.1.	Mammakarzinom-Zellen-Targeting	20
3.1.1.1.	Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel	20
3.1.1.2.	Zellkultur	22
3.1.1.3.	Bindungs-Studie	23
3.1.1.4.	Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung	24
3.1.1.5.	Wirkstoffwiederfindung	25
3.1.1.6.	Biologische Wirksamkeitstestung	26
3.1.2.	Melanom-Zellen-Targeting	26
3.1.2.1.	Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel	26
3.1.2.2.	Nachweis der Antikörper-Modifikation auf der Partikeloberfläche	27
3.1.2.3.	Zellkultur	28
3.1.2.4.	Bindungs-Studie	29
3.1.2.5.	Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung	29
	Konfokale Raster-Lasermikroskopie	29
	Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse	30
3.1.2.6.	Biologische Wirksamkeitstestung	31
	Zell-Attachment-Assay und Zell-Detachment-Assay	31
	Kinetik der Zell-Ablösung	32
	Zellviabilitäts-Assay	33
3.2.	Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke	34

3.2.1.	Apolipoprotein-modifizierte unbeladene Nanopartikel: Aufklärung des Transportmechanismus über die Blut-Hirn-Schranke	34
3.2.1.1.	Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel	34
3.2.1.2.	Zellkultur	35
3.2.1.3.	Bindungs-Studie	36
3.2.1.4.	Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung	37
	Konfokale Raster-Lasermikroskopie	37
	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie	37
3.2.1.5.	Zellviabilitäts-Assay	39
3.2.1.6.	Aufnahmemechanismus-Studien	40
	Untersuchungen zum Rezeptorstatus	40
	Koinkubationsexperimente	41
3.2.2.	Apolipoprotein-modifizierte beladene Nanopartikel: gezielter Wirkstofftransport über die Blut-Hirn-Schranke	42
3.2.2.1.	Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel	42
3.2.2.2.	Zellkultur	42
	Isolierung von primären porcinen Gehirnkapillarendothel-Zellen	42
	Kultivierung von primären porcinen Gehirnkapillarendothel-Zellen	48
	Kultivierung von Zelllinien	49
3.2.2.3.	Bindungs-Studie	49
3.2.2.4.	Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung	49
3.2.2.5.	Zellviabilitäts-Assay	49
3.2.2.6.	Messung des Transendothelialen elektrischen Widerstands und der Kapazität	50
3.2.2.7.	Transport- und Freisetzungs-Studie	50
4.	ERGEBNISSE	54
4.1.	Nanopartikel zum spezifischen Tumor-Targeting	54
4.1.1.	Mammakarzinom-Zellen-Targeting	55
4.1.1.1.	Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel	55
4.1.1.2.	Bindungs-Studie	56
4.1.1.3.	Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung	59
4.1.1.4.	Wirkstoffwiederfindung	61
4.1.1.5.	Biologische Wirksamkeitstestung	66
4.1.2.	Melanom-Zellen-Targeting	69
4.1.2.1.	Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel	69
4.1.2.2.	Nachweis der Antikörper-Modifikation auf der Partikeloberfläche	70
4.1.2.3.	Bindungs-Studie	72
4.1.2.4.	Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung	74
	Konfokale Raster-Lasermikroskopie	74
	Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse (FLIM)	78
4.1.2.5.	Biologische Wirksamkeitstestung	79
	Zell-Attachment-Assay und Zell-Detachment-Assay	79
	Kinetik der Zell-Ablösung	81
	Zellviabilitäts-Assay	81
4.2.	Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke	83
4.2.1.	Apolipoprotein-modifizierte unbeladene Nanopartikel: Aufklärung des Transportmechanismus über die Blut-Hirn-Schranke	83

4.2.1.1.	Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel	83
4.2.1.2.	Bindungs-Studie	84
4.2.1.3.	Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung	85
	Konfokale Raster-Lasermikroskopie	85
	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie	86
4.2.1.4.	Zellviabilitäts-Assay	87
4.2.1.5.	Aufnahmemechanismus-Studien	88
	Untersuchungen zum Rezeptorstatus	88
	Koinkubationsexperimente	89
4.2.2.	Apolipoprotein-modifizierte beladene Nanopartikel: gezielter Wirkstofftransport über die Blut-Hirn-Schranke	91
4.2.2.1.	Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel	91
4.2.2.2.	Bindungs-Studie	92
4.2.2.3.	Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung	92
4.2.2.4.	Zellviabilitäts-Assay	94
4.2.2.5.	Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands	95
4.2.2.6.	Transport- und Freisetzungs-Studie	97
5.	DISKUSSION	100
5.1.	Nanopartikel zum spezifischen Tumor-Targeting	100
	Mammakarzinom-Zellen-Targeting	100
	Melanom-Zellen-Targeting	104
5.2.	Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke	109
	Transportmechanismus-Studien	110
	Wirkstofftransport-Studien	115
6.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	119
7.	LITERATUR	123
	VERZEICHNISSE	132
	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	137
	LEBENS LAUF	141

1. Einleitung

Im Allgemeinen zeigen Arzneistoffe eine Körperverteilung, die durch ihre physikochemischen Eigenschaften bedingt ist. Daher erreicht nur ein geringer Teil des applizierten Arzneistoffs letztlich den gewünschten Zielort im Körper. Der verbleibende Teil ist verantwortlich für unerwünschte Nebenwirkungen oder andere toxische Effekte. Daher stellt man besondere Anforderungen an eine Arzneiform (Darreichungsform) wie Tabletten, Kapseln, Salben und Cremes. Sie selbst soll einfach in der Herstellung, untoxisch, möglichst biodegradierbar und nicht allergen sein. Des Weiteren wird an eine Arzneiform der Anspruch gestellt, dass sie die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffs erhöht und ihn schützt vor Umwelteinflüssen wie Licht, Luft und Feuchtigkeit, aber auch vor zu früher Degradierung im Körper, wie z. B. enzymatischem Abbau oder Destabilisierung durch Säureeinfluss. Daher ist es ein schon lange verfolgtes Ziel in der Pharmaforschung, Carriersysteme zu entwickeln, die ein gezieltes Transportieren und Freisetzen des Arzneistoffs am Wirkort ermöglichen. Schon Paul Ehrlich war mit seiner Vision von „Zauberkugeln“ auf der Suche nach solchen Strukturen [1]. Der beladene Wirkstoff soll so unter kontrollierten Bedingungen gezielt an seinen Wirkort im Körper transportiert werden. Dies stellt das so genannte „Drug-Targeting“ dar. Nach Erreichen des Wirkortes soll dann von diesen Arzneiformen der Arzneistoff unter kontrollierten Bedingungen über den gewünschten Zeitraum freigesetzt werden, das so genannte „Controlled Release“. Ein viel versprechender Ansatz dieses Ziel zu erreichen sind die so genannten nanopartikulären Arzneistoffsysteme.

1.1. Nanopartikuläre Arzneistoffsysteme

Was sind nanopartikuläre Arzneistoffsysteme?

Nanopartikuläre Arzneistoffsysteme sind meist feste kolloidale Arzneistoffträger mit matrixartiger Struktur. Im pharmazeutisch-medizinischen Bereich spricht man von Nanopartikeln im Größenbereich von 10 - 1000 nm. Sie können als Trägersysteme für Arzneistoffe genutzt werden [2-5]. Ihre Herstellung ist abhängig von dem Ausgangsmaterial und kann durch Polymerisation erfolgen wie bei Polyacrylamid [6, 7], Polyglutaraldehyd [8], Polyalkylmethacrylaten [9, 10] und Polyalkylcyanoacrylaten, oder durch Dispergieren von bestehenden Polymeren [5, 11]. Dabei unterscheidet

man natürliche Makromoleküle wie Serumalbumine, Natrium-Alginat, Gelatine und Chitosan von synthetischen Polymeren wie Polymilchsäure, Poly(milchsäure-co-glykolsäure), Poly- ϵ -caprolacton und Derivate der Polyacrylsäure.

Seit den 70er Jahren wird schon auf dem Gebiet der pharmazeutischen Nanopartikel-Forschung gearbeitet [6, 9, 12-15]. Ende der 80er Jahre hatte dann Akasaka et al. [16] Albumin-Nanopartikel mit zellspezifischen Antikörpern weiterentwickelt, und 2001 konnten erste Albumin-Nanopartikel zur Tumorthherapie in klinische Studien gehen [17]. 2005 wurden erstmals Albumin-Nanopartikel von der „Food and Drug Administration“ (FDA) als Arzneimittel zugelassen.

Die erste Generation an Nanopartikeln war völlig unmodifiziert, ohne Oberflächen-Veränderung. Diese Partikel wurden bzw. werden allerdings nach Opsonisierung recht schnell aus der Blutbahn durch Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) entfernt [2, 4, 18-21]. Dabei lagern sich Opsonine an die Oberfläche der Nanopartikel an, infolgedessen werden die Nanopartikel als körperfremd erkannt und durch Zellen des mononukleären Phagozytensystems, wie z. B. den Makrophagen, gefressen und abgebaut. Zum Schutz der Nanopartikel vor einem solchen Abbau hat man in einer Weiterentwicklung die Nanopartikel mit hydrophilen Oberflächenstrukturen, wie z. B. Polyethylenglykol (PEG) [22-24], versehen oder mit entsprechenden Tensiden [25-28], wie z. B. Polysorbat, Poloxamer 338, Poloxamin 908, oder Serumbestandteilen [22, 29] beschichtet, die zudem eine sterische Barriere ausbildeten [30, 31]. Dadurch erhält man so genannte „Stealth“-Partikel [32], die länger in der Blutbahn zirkulieren können [33-39] und damit eher ihr eigentliches Ziel erreichen können. Durch zusätzliche Anknüpfung von zellspezifischen Liganden, wie z. B. monoklonalen Antikörpern, ist es möglich zielgerichtete lang zirkulierende Partikel-Systeme zu entwickeln. Auch weitere individuelle Eigenschaften, wie z. B. pH-Sensitivität oder Radioaktivität, können gezielt bei der Partikel-Synthese für spezielle Anwendungen eingeführt werden. Damit ist ein breites Spektrum an multifunktionalen Nanopartikeln als Arzneistoff-Träger möglich (Abb.1).

Dabei können die Arzneistoffe adsorptiv oder kovalent an die Oberfläche der Nanopartikel gebunden werden oder in die Partikelmatrix inkorporiert werden [3, 4]. Die Art der Arzneistoff-Beladung beeinflusst in gewissem Sinne auch deren zeitliche Freisetzung, denn von einer oberflächlichen Beladung ist schneller eine Freisetzung des Wirkstoffs zu erwarten als durch die Partikelmatrix.

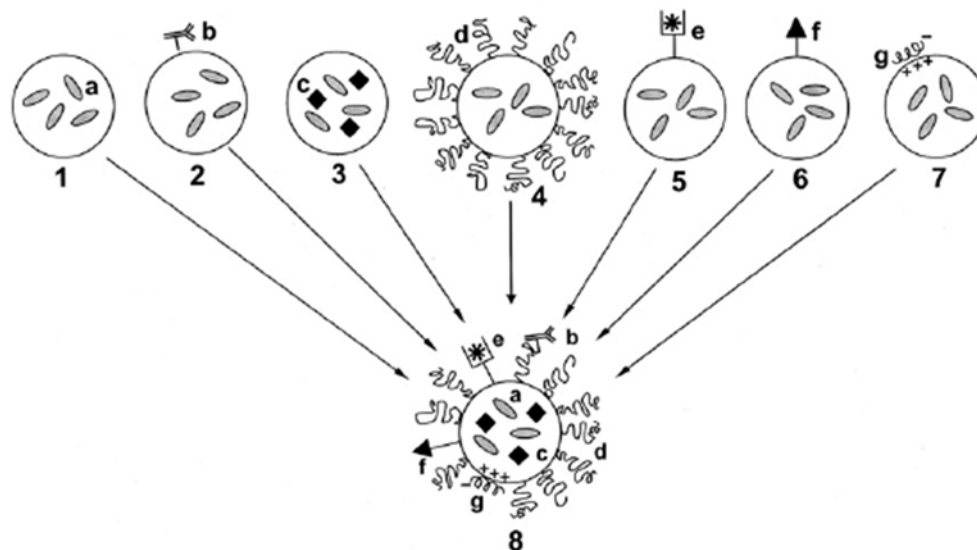


Abb.1 Schematische Strukturen multifunktionaler pharmazeutischer Nanocarrier.

1) unmodifizierter Nanopartikel mit a) Wirkstoff-Beladung; 2) zielgerichteter Nanopartikel mit b) spezifischem Ligand, häufig monoklonale Antikörper; 3) magnetische Nanopartikel mit c) Beladung mit magnetischen Partikeln zusammen mit dem Wirkstoff; 4) lang zirkulierende Nanopartikel mit d) hydrophiler Oberflächenstruktur, meist PEG; 5) Kontrastpartikel mit e) Schwermetallatom oder radioaktiver Modifikation für Radioaktiv- oder MRI-Bildgebung; 6) zellpenetrierender Nanopartikel mit f) „Cell Penetrating Peptide“ (CPP)-Modifikation zur schnelleren zellulären Aufnahmen; 7) DNA-tragender Nanopartikel mit g) DNA, komplexiert durch die positive Partikeloberflächenladung; 8) hypothetischer multifunktionaler pharmazeutischer Nanopartikel, der alle Eigenschaften aus 1-7 kombiniert (nach Vladimir P. Torchilin [31]).

Was können sie leisten?

Nanopartikuläre Arzneistoffsysteme eignen sich zum Einsatz in der Tumorthherapie, denn durch den EPR-Effekt (siehe Abschnitt 1.2.1.) reichern sie sich spezifisch in bestimmten Tumoren und auch anderen Organen an [40]. Durch die Möglichkeit diese Nanopartikel zielgerichtet zu modifizieren, steckt ein großes Potential in diesen Partikel-Systemen zum spezifischen Erreichen von Zielzellen und zur Überwindung biologischer Barrieren, wie z. B. der Blut-Hirn-Schranke [41]. Sie können die Lösung schwerlöslicher Arzneistoffe vermitteln und wie schon erfolgreich seit 2005 in dem von der FDA zugelassenen Präparat Abraxane® demonstriert, die Bioverfügbarkeit einiger Wirkstoffe verbessern und deren Toxizität erniedrigen.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Nanopartikel auf HSA-Basis wurden über eine Desolvationstechnik hergestellt. Bei dieser Technik erfolgte die Phasentrennung der kolloidalen Lösung durch Zugabe des organischen Lösungsmittels Ethanol. Die gebildeten Nanopartikel wurden durch Zugabe von Glutaraldehyd quervernetzt. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Langer (ehemals am Institut für Pharma-

zeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, jetzt am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster) wurde die Synthese HSA-basierter Nanopartikel mittels Desolvatation unter definierten Bedingungen etabliert, optimiert und für die Herstellung der in dieser Arbeit getesteten Nanopartikel verwendet [42-49].

Humanes Serumalbumin (HSA) ist der Hauptbestandteil der Plasmaproteine im menschlichen Blut und hat als Trägermaterial für nanopartikuläre Arzneistoffsystemen dabei gleich mehrere Vorteile [45, 46]: Es zeigt eine gute Biokompatibilität und ruft keine Antigenität bei der Applikation am Menschen hervor [50]. HSA-Nanopartikel lassen sich einfach und reproduzierbar nach einem Desolvatationsverfahren herstellen, und ihre Oberfläche ist gut unter stöchiometrischen Bedingungen modifizierbar [44, 51-54]. Durch die Verwendung von bioabbaubarem HSA als Trägermaterial kommt es nach zellulärer Aufnahme der Nanopartikel zu einem schnellen Abbau der Partikelmatrix und Freisetzung des Wirkstoffes. Dadurch wird eine in der Öffentlichkeit kritisch beobachtete Akkumulation der Nanopartikel im Körper vermieden.

1.2. Nanopartikuläre Arzneistoffsysteme zur Tumorthherapie

1.2.1. Drug-Targeting

Mit Nanopartikeln als Arzneistoffträger ist ein so genanntes „Drug-Targeting“, d. h. ein selektiver Wirkstofftransport an einen bestimmten Wirkort möglich. Man unterscheidet dabei das passive und das aktive Drug-Targeting [55].

Passives Drug-Targeting

In normalem, gesundem Körpergewebe ist die Gefäß-auskleidende Endothelzellschicht so dicht, dass Nanopartikel die Blutgefäße nicht verlassen können. In Tumoren kommt es jedoch durch die gesteigerte Angiogenese zum fehlerhaften Aufbau der Blutgefäße in Kombination mit mangelhafter Lymphdrainage [56]. Daher weisen tumorale Blutgefäße eine löchrige Struktur von 200 - 600 nm Loch-Durchmesser auf. Nanopartikel können durch diese Lücken in der fehlerhaften Vaskularisierung der Tumoren in das Tumorgewebe eintreten und dort akkumulieren [57]. Dieser Effekt wird „Enhanced Permeability and Retention“ (EPR)-Effekt genannt und liegt dem passiven Drug-Targeting zugrunde. Er führt generell dazu, dass sich

Nanopartikel in Tumoren anreichern [56]. Jedoch wird durch das längere Verweilen der oben beschriebenen „Stealth“-Partikel im Körper dieser Effekt besonders ausgenutzt (Abb.2) [58, 59].

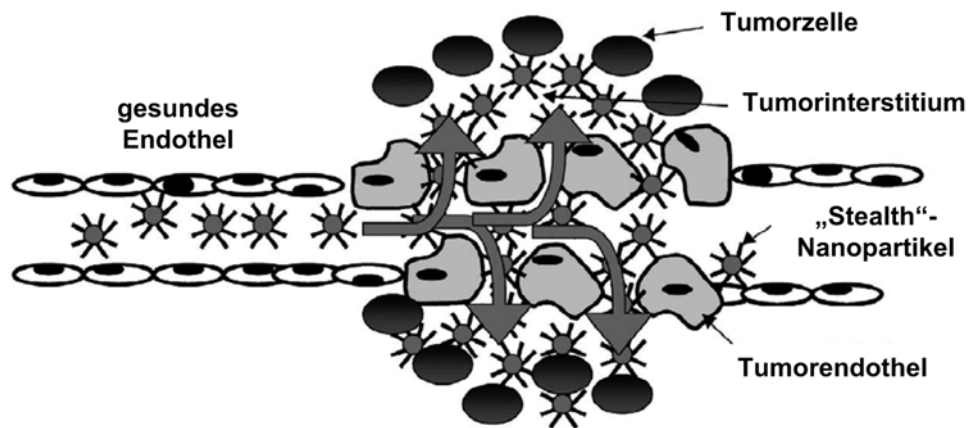


Abb.2 „Enhanced Permeability and Retention“ (EPR)-Effekt.

Lange in der Blutbahn zirkulierenden „Stealth“-Partikel können sich aufgrund der fehlerhaften Vaskularisierung und mangelhafter Lymphdrainage im Tumor anreichern (modifiziert nach Brigger et al. [20]).

Aktives Drug-Targeting

Bei dem aktiven Drug-Targeting werden zielgerichtete Nanopartikel eingesetzt, die eine zellspezifische Anreicherung bewirken [52, 60]. Dabei werden vornehmlich Zuckerketten, Proteinfragmente, Lektine, Hormone, Apolipoproteine und monoklonale Antikörper als Liganden eingesetzt, die mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren [4, 16, 51-54, 61-67]. Dadurch reichern sich die Nanopartikel nicht nur passiv, aufgrund des EPR-Effekts, im Tumorgewebe an, sondern werden aktiv in die Tumorzellen aufgenommen.

1.2.1.1. Monoklonale Antikörper als Liganden

Besonders monoklonale Antikörper, die schon eine Zulassung in der Monotherapie haben [68-72], werden gerne zur Liganden-Modifikation der Nanopartikel eingesetzt [70]. Sie erkennen Rezeptoren, die auf der Zellmembran exprimiert bzw. über-exprimiert sind.

HER2/neu (ErbB2) als Target

Ein solcher Rezeptor ist der HER2/neu (ErbB2)-Rezeptor. Er gehört neben ErbB1 (EGFR, HER1), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) zu den vier transmembranen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR), einer Unterklasse der Tyrosin-Kinase-Rezeptor-Superfamilie [73-76]. Diese besitzen eine extrazelluläre, Liganden-bindende Domäne, eine transmembran Domäne und eine intrazelluläre Domäne, die für die Tyrosin-Kinase Aktivität zuständig ist [73]. Eine Bindung von Rezeptoren an die extrazelluläre Domäne führt zu einer Homo- bzw. Heterodimerisierung der Rezeptoren, was eine Aktivierung der Kinase-Aktivität und Phosphorylierung nach sich zieht. Dies stößt eine Kaskade von Signalwegen an, die Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Migration der Zellen induzieren [73-76], alles Prozesse, die auch beim Tumorwachstum eine große Rolle spielen. Gerade EGFR und HER2 werden besonders in Zusammenhang mit der Krebsentwicklung gesehen [74]. Bei 25 – 30 % aller primären Mammakarzinome ist eine Überexpression von HER2 zu beobachten, was in den meisten Fällen auf eine HER2-Genamplifikation zurückzuführen ist [77, 78]. Diese Patientinnen haben eine schlechtere Prognose für den Krankheitsverlauf und schlechtere Überlebenschancen. Oftmals treten Resistenzen gegenüber vielen Zytostatika auf [76, 78-82].

Trastuzumab als Ligand

Trastuzumab (Herceptin[®]) erkennt und blockiert die extrazelluläre Domäne der überexprimierten HER2-Rezeptoren auf Tumorzellen. Er verhindert damit, dass Wachstumsfaktoren an die Tumorzellen binden, weitere Tumorwachstum-fördernde Signalwege angestoßen werden, und er forciert das Internalisieren und den Abbau des Rezeptors. Zusätzlich aktiviert er durch die Bindung an die Zelloberfläche immunologische Effektormechanismen, die körpereigene Fress- und Killerzellen hervorrufen und die Tumorzelle attackieren [83]. Auch anti-angiogenetische Eigenschaften werden ihm zugesprochen, allerdings ist der genaue Wirkmechanismus von Trastuzumab noch nicht vollständig geklärt (Abb.3) [77, 83].

Bei Trastuzumab handelt es sich um einen gentechnisch hergestellten humanisierten, monoklonalen Antikörper (mAb) der IgG1-Klasse [83, 84]. Trastuzumab wird hauptsächlich zur Behandlung von metastatisierendem Mammakarzinom eingesetzt, aber auch der Einsatz bei anderen HER2-überexprimierenden Krebsarten, wie z. B. manchen gynäkologischen Krebsarten, wird derzeit diskutiert

und erforscht [85]. Es hat sich gezeigt, dass bei der Therapie mit Trastuzumab eine Kombination mit Zytostatika erfolgreicher ist als eine Monotherapie mit Trastuzumab [77, 83]. Dabei gehören Taxane, wie Paclitaxel und Docetaxel, zu den Kombinationspartnern, aber auch Anthrazykline bringen eine Verbesserung in der Therapie [86]. Neben dieser erwünschten Wirkung kann es jedoch bei der Trastuzumab-Monotherapie in weniger als 5 % der Fälle zu kardiotoxischen Komplikationen mit einer reversiblen Herzinsuffizienz kommen, deren Mechanismus noch ungeklärt ist [87]. Diese auftretende Kardiotoxizität wird durch die Kombinationstherapie mit Zytostatika noch verstärkt [77, 84]. Daher wird die Herzfunktion bei den Patienten ständig überwacht. Gerade Anthrazykline, mit Doxorubicin als Standardvertreter, bereiten hier auf der einen Seite die größten Schwierigkeiten, auf der anderen Seite haben klinische Studien gezeigt, dass HER2-überexprimierende Tumore auf Anthrazyklin-haltige Chemotherapien besonders gut ansprechen [86].

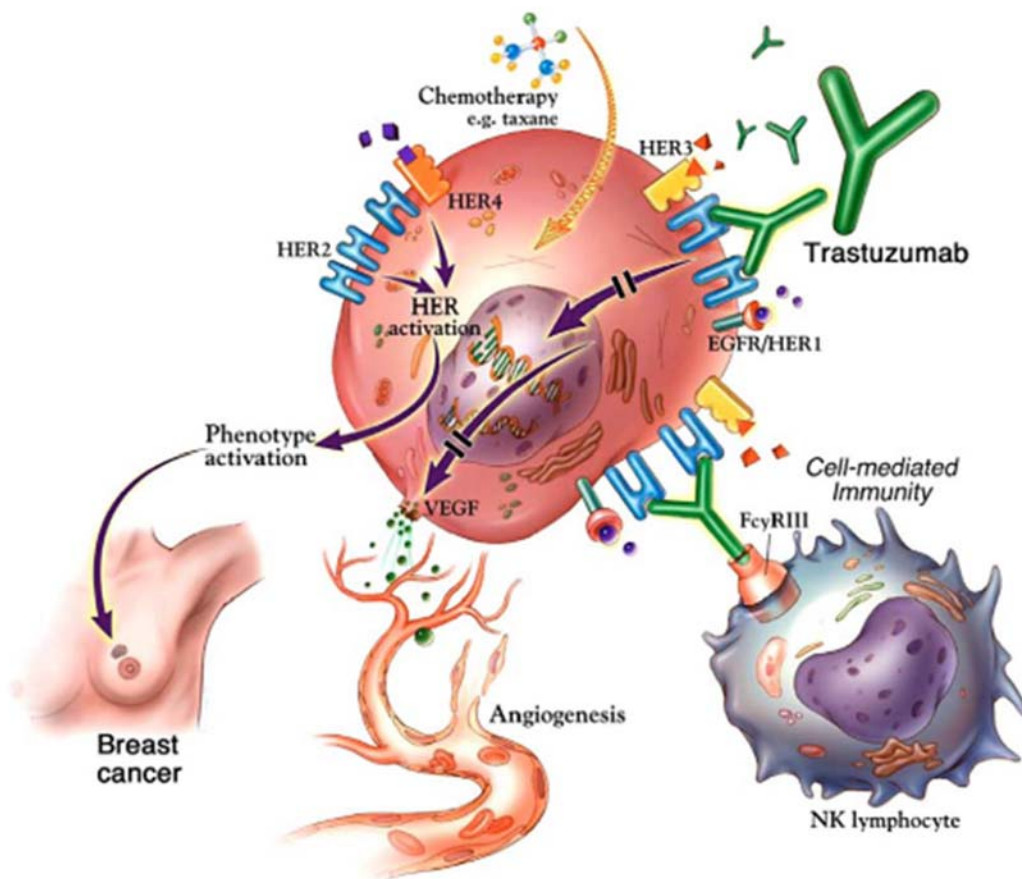


Abb.3 Diskutierte Wirkmechanismen von Trastuzumab (Herceptin®).

Die genauen Wirkmechanismen von Trastuzumab (Herceptin®) sind noch nicht vollständig geklärt (nach Nahta et al. [83]).

$\alpha_v\beta_3$ -Integrine als Target

Ebenso wie der HER2-Rezeptor eignen sich $\alpha_v\beta_3$ -Integrine als Target in der spezifischen Tumorthherapie, denn auch diese $\alpha_v\beta_3$ -Integrine sind bei einigen Krebsarten und tumoralem Endothel überexprimiert [88-96]. Die $\alpha_v\beta_3$ -Integrine sind Rezeptoren für extrazelluläre Matrix-Liganden wie Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen und Laminin. Aber besonders Vitronectin wird mit den $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen in Verbindung gebracht. Daher werden diese Integrine auch Vitronectin-Rezeptoren genannt. Die $\alpha_v\beta_3$ -Integrine sind so gut wie gar nicht oder nur schwach auf vielen Geweben und Zellen exprimiert, aber sie sind in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und besonders in Blutgefäßen und Tumoren nach deren Aktivierung durch Zytokine überexprimiert [97-101]. Daher haben diese Integrine eine wichtige Funktion während der Angiogenese. $\alpha_v\beta_3$ -Integrine sind involviert in das Melanom-Wachstum. $\alpha_v\beta_3$ -Inhibitoren blockieren die Angiogenese und das Tumorwachstum [102, 103]. Aufgrund dieser Unterschiede in der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression können zielgerichtete Wirkstoff-Carrier maßgeschneidert werden, um einen spezifischen Transport der anti-tumoralen Wirkstoffe zu den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-überexprimierenden Krebszellen zu ermöglichen. Dabei sind die Integrine nicht nur die Andockstellen („Adhesion Sites“) der Zellen, sondern die Integrine haben im Zusammenspiel mit der Zelle auch andere Funktionen und sind involviert in die Angiogenese, die Proliferation, die Migration und das Zellüberleben. Ihre Blockade kann das Ablösen der Zellen, Immobilisierung und Apoptose induzieren. Die $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrine stehen in engem Zusammenhang mit angiogenetischen Prozessen und der Tumorangiogenese. Sie sind in ruhenden Blutgefäßen geringfügig exprimiert. Dagegen ist die Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen während der Angiogenese signifikant hoch reguliert. Des Weiteren scheint bei manchen Krebsarten, wie z. B. dem Mammakarzinom und dem Melanom, die Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen mit der Aggressivität der Krankheit zu korrelieren [104, 105]. Daher verhindern $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antagonisten nicht nur das Wachstum der tumor-assoziierten Blutgefäße, sondern sie induzieren auch eine Regression des vorhandenen Tumors *in vivo*. In der aktuellen Forschung sind verschiedene Antikörper, Antagonisten und kleine Inhibitormoleküle für mögliche anti-angiogenetische Strategien in der Tumorthherapie entwickelt worden [104, 106]. Dies zeigt, dass die $\alpha_v\beta_3$ -Integrine ein potenzielles Target auf Endothelzellen für eine spezifische anti-angiogenetische Therapie sein können, wodurch das Tumor-

wachstum und die Neovaskularisierung gehemmt und der Tumor-Apoptose-Index erhöht wird [101, 107].

DI17E6 als Ligand

DI17E6 ist ein humanisierter, deimmunisierter, monoklonaler Antikörper, der α_v -Integrine inhibiert. Einige Daten des Herstellers weisen darauf hin, dass besonders $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-exprimierende Tumore und Blutgefäße besonders sensitiv für DI17E6 sind (unveröffentlichte Daten, persönliche Kommunikation von Merck KGaA). *In vitro* blockiert dieser Antikörper einerseits die Zelladhäsion und Migration, andererseits induziert er das Ablösen der Zellen von Vitronektin-beschichteten Oberflächen. In Endothelzellen induziert er auch Apoptose. Die Kombination mit Chemotherapie sieht Erfolg versprechend aus. *In vivo* inhibiert DI17E6 das Melanom-Wachstum und die Tumor- und Wachstumsfaktor-induzierte Angiogenese. Daher kann DI17E6 als zweifache Waffe in der Tumorthherapie eingesetzt werden [102, 103] (unveröffentlichte Daten, persönliche Kommunikation von Merck KGaA). DI17E6 befindet sich zurzeit in der Klinischen Phase I der Testung.

Mit Nanopartikeln, die mit solchen Antikörpern modifiziert sind, kann eine neue therapeutische Strategie in der Krebsbekämpfung eröffnet werden, die eine zielgerichtete Chemotherapie durch die selektive zelluläre Anreicherung der an die Partikelsysteme gebundenen Arzneistoffe ermöglicht.

1.2.2. Doxorubicin

Doxorubicin ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Anthrazyklin-Antibiotika. Anthrazykline sind aus Pilzen, den Streptomyces-Arten, isolierte Antibiotika, die in der Chemotherapie als Zytostatika gegen verschiedene Krebsarten eingesetzt werden. Dabei ist Doxorubicin eines der am häufigsten eingesetzten Zytostatika zur Therapie von malignen Tumoren. Die Wirkung von Doxorubicin kann durch zwei Hauptmechanismen erklärt werden. Zum einen interkaliert Doxorubicin in die DNA, wo es sich zwischen benachbarte Nukleotide in der DNA schiebt und dadurch deren Transkription blockiert. Doxorubicin hemmt damit die Nukleinsäuresynthese und induziert so den Zelltod. Zum anderen hemmt Doxorubicin die Topoisomerase II, ein Schlüsselenzym der DNA-Synthese. Am empfindlichsten reagieren Körperzellen in

der S-Phase des Zellzyklus auf die Substanz. Deshalb sind schnell proliferierende Tumorzellen stärker als gesunde Zellen von der toxischen Wirkung betroffen. Ein weiterer Wirkmechanismus ist die Bildung freier Radikale, die Doppelstrangbrüche an der DNA erzeugen können. Ferner wird durch Bindung der Anthrazykline an die Zellmembran deren Permeabilität und Fluidität erhöht, was zu vermehrtem Absterben der betroffenen Zellen führt. Wegen des schnellen Wachstums von Krebszellen werden diese stärker durch die Wirkung von Doxorubicin gestört als gesunde Zellen. Allerdings werden auch gesunde Körperzellen angegriffen, was zu schweren, teilweise irreversiblen Nebenwirkungen führen kann. Zu den wichtigsten gehören Knochenmarkdepression und Kardiotoxizität. Doxorubicin hat aufgrund seiner aromatischen, planaren Ringstruktur eine Autofluoreszenz, die bei verschiedenen Methoden wie konfokaler Raster-Lasermikroskopie (CLSM), Durchflusszytometrie (FACS) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zu dessen Nachweis genutzt werden kann. Durch diese Fluoreszenzeigenschaften waren Untersuchungen zum Ausschleusen von Doxorubicin aus der Zelle möglich, und das „Multi Drug Resistance-Related Proteine“ MRP1 aus der Familie der ABC-Transporter konnte identifiziert werden. Ferner kann Doxorubicin eingesetzt werden, um die Lage und die Aktivität der Efflux-Pumpen zu studieren sowie die an der „Multi Drug Resistance“ beteiligten Proteine und Organellen.

1.3. Nanopartikuläre Arzneistoffsysteme zur Überwindung biologischer Barrieren

1.3.1. Die Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine der wichtigsten und undurchlässigsten physiologischen Barrieren im Organismus. Ihre Entdeckung 1885 geht auf Paul Ehrlich zurück, der durch intravenöse Applikation von Trypanblau bei Versuchstieren zeigte, dass alle Gewebe mit Ausnahme des Gehirns und des Rückenmarks angefärbt wurden. Erst Mitte der 60er Jahre, nach Entwicklung spezieller Elektronen-Mikroskopie-Techniken, konnten die cerebralen Endothelzellen als zelluläre Grundlage der Blut-Hirn-Schranke identifiziert werden. Diese Gehirnkapillarendothel-Zellen unterscheiden sich deutlich sowohl morphologisch als auch durch metabolische Eigenschaften vom Endothel im restlichen Körper. Die Endothelzellen der BHS sind durch feste „Tight Junctions“ miteinander verknüpft [108], so dass keine Fenestrierung

zwischen den Zellen besteht. Daher bilden diese Zellen einen hohen transendothelialen elektrischen Widerstand (TER), der *in vivo* Werte bis $2000 \Omega\text{cm}^2$ erreichen kann [109, 110]. Des Weiteren ist die Zahl pinocytotischer Vesikel, einem morphologischen Hinweis für parazellulären Transport, stark reduziert. Dagegen haben die Gehirnkapillarendothel-Zellen eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien, ein Zeichen für erhöhte Stoffwechselaktivität. Die Gehirnkapillarendothel-Zellen sind umgeben von Astrozyten, Mikrogliazellen, Perizyten und Nervenenden (Abb.4). Sie haben einen essentiellen Anteil bei der Aufrechterhaltung der BHS-Eigenschaften [111].

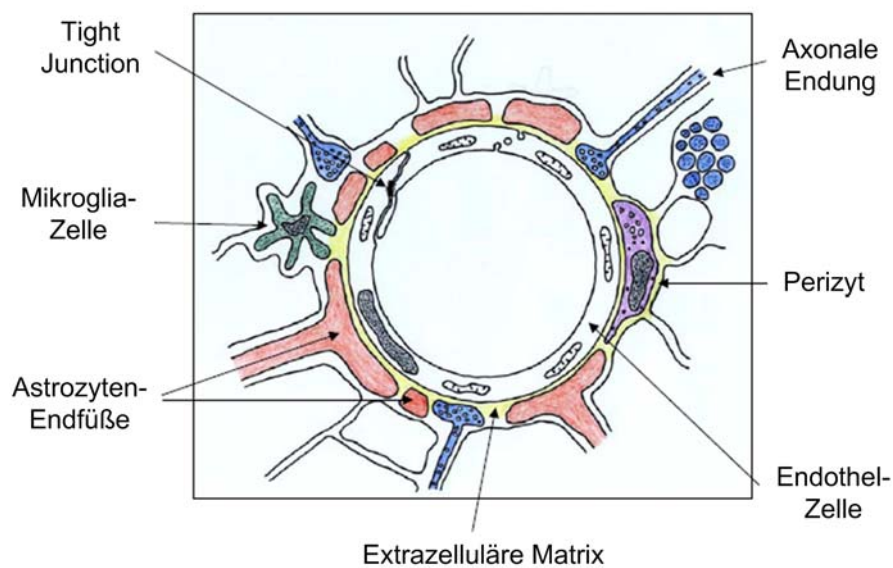


Abb.4 Schematischer Querschnitt durch eine Gehirnkapillare.

Gehirnkapillarendothel-Zellen bilden die zelluläre Grundlage der BHS. Sie sind umgeben von Astrozyten-Endfüßen, Mikrogliazellen, Perizyten und Nervenenden. „Tight Junctions“ verschließen den interzellulären Raum zwischen den Endothelzellen sehr fest und verhindern die freie Diffusion polarer, hydrophiler Substanzen (modifiziert nach Begley et al. [112]).

Nur lipophile bzw. kleine hydrophobe Moleküle können die Blut-Hirn-Schranke mittels Diffusion passieren, für große Moleküle, Peptide und Proteine existieren teilweise rezeptorvermittelte, spezifische Transportsysteme (Abb.5) [112, 113].

Damit schützt die BHS einerseits das zentrale Nervensystem vor toxischen Substanzen und erhält die Hömoostase des Gehirns, andererseits verhindert sie aber damit oftmals die Aufnahme von Arzneistoffen in therapeutisch relevanten Konzentrationen [114]. In der Vergangenheit gab es verschiedene Strategien diese Barriere zu umgehen, wie z. B. das osmotische Öffnen der „Tight Junctions“, der Einsatz von Prodrugs oder Carriersystemen wie Antikörper oder Liposome [112, 114-116].

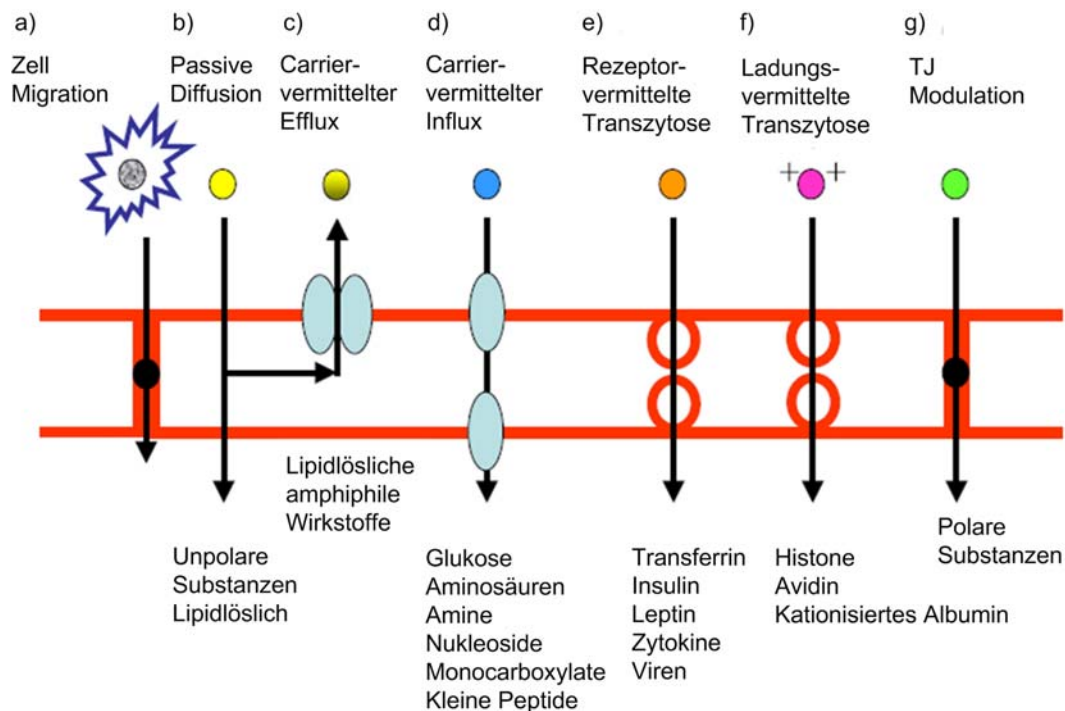


Abb.5 Mögliche Transportwege über die BHS (modifiziert nach Begley et al. [112]).

1.3.2. Historische Entwicklung der Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Ein sehr Erfolg versprechender Ansatz zur Überwindung der BHS ist der Einsatz von Nanotechnologie [36, 117, 118]. Es ist bisher gelungen, verschiedene nanopartikulär verpackte Wirkstoffe mit verschiedenen chemischen Eigenschaften und medizinischen Wirkungen, wie z.B. Doxorubicin [119-121], Dalargin [117, 122, 123], Loperamid [124-126] und einige andere [123, 127, 128] über die BHS zu transportieren. Dabei ermöglichten oder verstärkten diese Partikel-Systeme nicht nur den Transport des Wirkstoffs über die BHS, sondern sie schützten auch den aktiven Wirkstoff vor enzymatischem Abbau und waren sogar in der Lage, Nebenwirkungen zu verringern [129]. Schon lange gibt es Hinweise darauf, dass besonders Apolipoprotein-modifizierte Nanopartikel sehr gut geeignet sind, Wirkstoffe über die BHS zu transportieren [126, 130]. So konnte z. B. mit Hilfe der zwei-dimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE) gezeigt werden, dass an Polysorbat 80-beschichteten Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikeln, die die BHS passieren können, eine bevorzugte Adsorption von ApoE aus der Blutbahn stattfindet [131, 132]. Weiterführende Arbeiten zeigten eine eindeutige Korrelation zwischen einer

ApoE-Adsorption und der BHS-Passage. So waren unbeschichtete Dalargin-beladene oder Loperamid-beladene Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel nach der Beschichtung mit Polysorbat 80 und/oder der Adsorption von Apolipoprotein E oder Apolipoprotein B in *in vivo* Experimenten in der Lage, die BHS zu passieren und den Wirkstoff über die BHS zu transportieren [117, 122, 133]. Die Adsorption anderer Apolipoproteine außer Apolipoprotein AI führte dagegen zu keinem Effekt [133]. Es scheint so, als ob diese Nanopartikel Lipoprotein-Partikel imitieren und so über die Endothelzellen, die verschiedene Lipoprotein-Rezeptoren exprimieren, durch Rezeptor-vermittelte Endozytose ins Gehirn aufgenommen werden [112, 128, 130, 133-136]. Die Tatsache, dass Nanopartikel aus humanem Serumalbumin, an die Apolipoprotein E oder Apolipoprotein AI adsorbiert oder kovalent gebunden wurde, ebenfalls Wirkstoffe über die BHS transportieren [126, 133, 137], unterstützt diese Annahme. Allerdings ist der Mechanismus wie diese Partikel die BHS überwinden und welche Rezeptoren eventuell daran beteiligt sind noch nicht vollständig geklärt.

1.3.2.1. Apolipoprotein E als Ligand

Apolipoproteine sind Carrierproteine, die zusammen mit den Lipiden die Lipoproteine wie den Chylomikronen, dem „Very Low Density Lipoprotein“ (VLDL), dem „Low Density Lipoprotein“ (LDL), dem „Intermediate Density Lipoprotein“ (IDL) und dem „High Density Lipoprotein“ (HDL) bilden, die die wasserunlöslichen Lipide im Blut transportieren. Dabei bezeichnet man den Proteinanteil der Lipoproteine als Apolipoproteine. Sie bilden zusammen mit den Phospholipiden die wasserlösliche, hydrophile Oberfläche der Lipoproteine. Die Apolipoproteine fungieren als strukturelles Gerüst und Linker für die Bindung an Membranrezeptoren. Als stabilisierende Proteinkomponenten der Lipoproteine besitzen sie spezifische Funktionen im Lipidtransport, die in der Aktivierung bzw. Inhibierung bestimmter Enzyme des Lipidstoffwechsels und in der Rezeptorinteraktion liegen. Die Kombination der unterschiedlichen Apolipoproteine auf einem Lipoprotein ändert sich mit fortschreitender Verstoffwechselung im Blutkreislauf, d. h. die Apolipoproteine können zwischen einzelnen Lipoproteinpartikeln hin- und herwechseln und die Apolipoprotein-Zusammensetzung zeigt die aktuelle Lipid-Zusammensetzung des Lipoproteins an. Damit dirigieren die Apolipoproteine die Lipoproteine in den Stoffwechselwegen, bis sie in den entsprechenden Körperzellen angekommen sind

und aufgenommen werden. Apolipoproteine werden hauptsächlich in der Leber und im Dünndarm synthetisiert.

Das Apolipoprotein E (ApoE) ist das strukturell und funktionell am besten charakterisierte Apolipoprotein [138]. Es ist ein 34,2 kDa großes, helikales Protein, das aus 299 Aminosäuren besteht. Es ist aus zwei unabhängigen und unterschiedlich gefalteten, helikalen Domänen aufgebaut, einer globulären N-terminalen Domäne, die die LDL-Rezeptor-Bindungsregion enthält, und einem C-Terminus, der für die Lipidbindung verantwortlich ist [138-140]. ApoE ist ein wichtiges Apolipoprotein des Chylomikrons und wird in verschiedenen Zellen, Geweben und Organen im Körper für den Transport von Triglyzeriden, fettlöslichen Vitaminen und Cholesterin genutzt, die es zuerst in die Lymphbahnen und dann ins Blut transportiert. Auch für den Transport von Lipoproteinen ins Gehirn spielt es eine wichtige Rolle [140-142]. Dabei bildet die Bindung an den LDL-Rezeptor und andere Mitglieder dieser Rezeptor-Familie eine Schlüsselrolle [140]. Die Bedeutung des ApoE geht aber weit über seine zahlreichen Funktionen im Lipidstoffwechsel hinaus. ApoE wird vor allem in der Leber exprimiert, aber auch im Gehirn, den Nieren und der Milz. Im Gehirn produzieren vor allem Mikroglia- und Astrogliazellen ApoE. Neuronen exprimieren vor allem Rezeptoren für ApoE. Diese Rezeptoren gehören zur Familie der LDL-Rezeptoren.

Die LDL-Rezeptor Familie

Die Lipoprotein-Rezeptoren sind Plasmamembran-Rezeptoren, die für die spezifische Bindung und Aufnahme der im Blutkreislauf zirkulierenden Lipoproteine in Gewebe verantwortlich sind. In der nach ihrem Prototyp, dem LDL-Rezeptor, benannten LDL-Rezeptor-Familie sind mittlerweile mehrere verschiedene Rezeptoren bekannt, wie z. B. der ApoE-Rezeptor, das „Low Density Lipoprotein Related Protein“ (LRP), Megalin und viele andere. Die Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie kontrollieren diverse physiologische und Entwicklungs-Wege. Alle Mitglieder enthalten die gleichen sich wiederholenden Struktureinheiten [143] (Abb.6). Sie besitzen alle eine aminoterminal, extrazelluläre Liganden-Bindungsstelle aus komplementären, sich wiederholenden Einheiten und eine dem epidermalen Wachstumsfaktor homologe Domäne, die an der intrazellulären pH-abhängigen Dissoziation von Rezeptor und Ligand beteiligt ist. Eine weitere sich anschließende Domäne hat stützende Funktion. Die Rezeptoren sind in der Plasmamembran durch

ein einzelnes Membran-umspannendes Segment verankert. Die zytoplasmatische Domäne, die sich daran anschließt, enthält in den meisten Fällen Signale für die Endozytose und verschiedene Bindungsmotive.

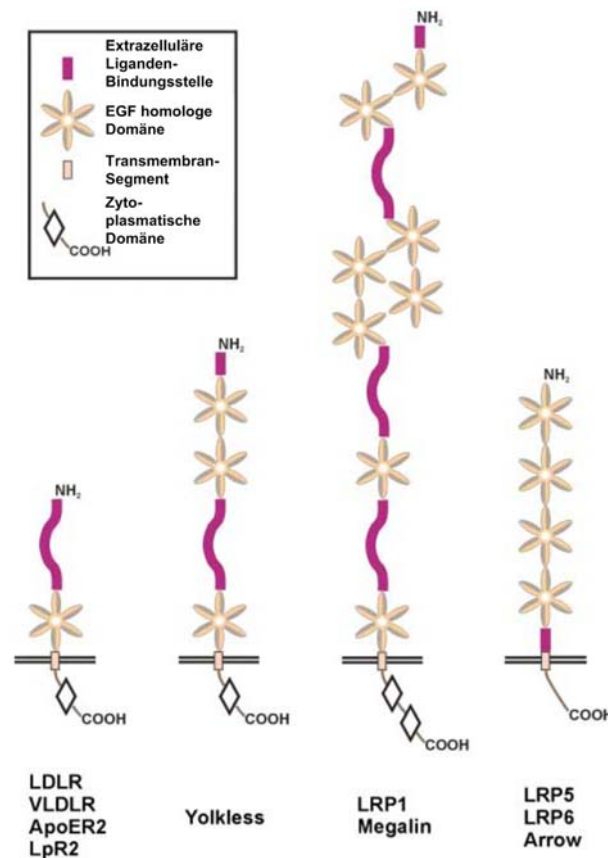


Abb.6 Schematische Darstellung der strukturellen Organisation der verschiedenen Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie (modifiziert nach Hertz und Marschang [143]).

RAP

Das „Receptor Associated Protein“ (RAP) ist, neben BiP, BOCA und MESD, eines der Chaperone, die in die Biosynthese der LDL-Rezeptor-Familie involviert sind [143-146]. RAP ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und sorgt für eine richtige Faltung der meisten Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie und für deren Export aus dem ER. Dabei bindet RAP an die Liganden-Bindungsdomäne der LDL-Rezeptoren und verhindert somit eine frühzeitige intrazelluläre Interaktion der Rezeptoren mit Liganden, die in demselben Kompartiment vorkommen (Abb.7). Es vermittelt somit, dass die Rezeptoren an der Zelloberfläche sezerniert werden.

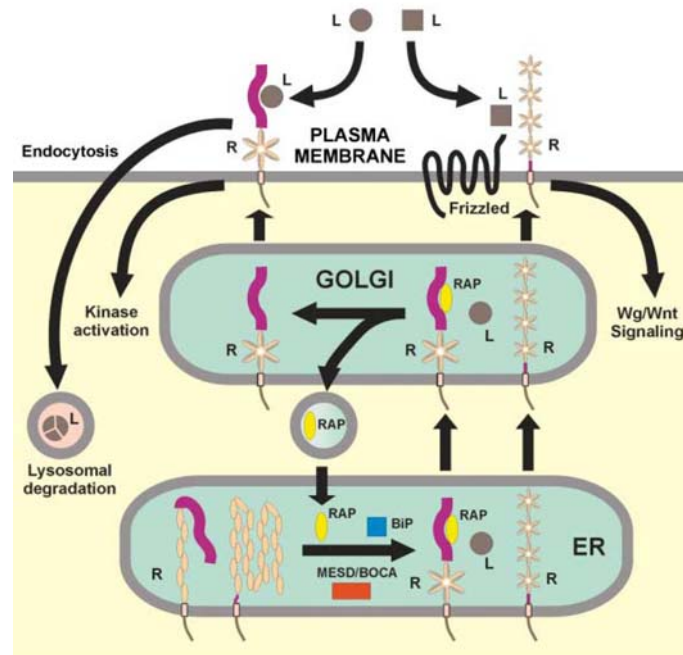


Abb.7 Schematische Darstellung der Biosynthese und Sekretion der LDL-Rezeptor-Familie im Zusammenhang mit RAP.

Chaperone (BiP, Boca, MESD, RAP) unterstützen die richtige Faltung des naszierenden Lipoprotein-Rezeptors (R) im endoplasmatischen Retikulum (ER). RAP bindet an die Liganden-Bindungsdomäne des Rezeptors und verhindert damit eine frühzeitige intrazelluläre Bindung von Liganden (L), die im selben Kompartiment vorhanden sind. RAP dissoziiert vom Rezeptor im Golgi-Apparat und wird zurück ins ER recycelt. Der richtig gefaltete Rezeptor interagiert mit physiologischen Liganden an der Zellmembran, vermittelt ihre Endozytose und/oder aktiviert verschiedene Signalwege (nach Hertz und Marschang [143]).

Nanopartikel, die mit solchen Liganden wie dem ApoE modifiziert sind, die einen Transport über die BHS vermitteln, sind viel versprechende Drug-Carrier, um Arzneistoffe in therapeutisch relevanten Konzentrationen ins Gehirn zu schleusen.

1.3.3. Oxime als Antidote bei Organophosphat-Vergiftungen

Der beträchtliche Gebrauch von Organophosphaten (OP) in der Landwirtschaft als Insektizide und Pestizide und der Missbrauch für Selbstmord-Versuche verursacht weltweit mehrere hunderttausend Vergiftungen und Todesfälle pro Jahr [147-151]. Dabei sind leichte Vergiftungen hauptsächlich durch unfallhafte Exposition [150, 152-154] und schwere Fälle meist durch suizidalen Gebrauch verursacht [155, 156]. Die klassischen Organophosphate, auch bekannt als Nervengase, sind Tabun, Sarin, Soman und VX. Sie sind äußerst toxisch und eine der tödlichsten chemischen Waffen. Der immer wieder kehrende Einsatz von Nervengasen bei militärischen Konflikten und durch Terroristen [157] ist eine fortwährende Bedrohung der

Bevölkerung. Daher besteht immer noch die Notwendigkeit, eine effektive medizinische Behandlung für OP-Vergiftungen zu entwickeln. Die akuten toxischen Effekte von Organophosphaten ergeben sich hauptsächlich durch eine lang anhaltende Inhibierung der Acetylcholinesterase (AChE) durch Phosphorylierung (beinhaltet Phosphorylierung und Phosphonylierung) des aktiven Serinzentrums. Dies führt sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem [158] zu inaktiven Enzymen [159-161]. Die AChE reguliert normalerweise die Konzentration des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) [162]. Ihre Inaktivierung führt zu einem Anstieg der synaptischen ACh-Konzentration. ACh akkumuliert und induziert somit eine Überstimulation der cholinergen Rezeptoren und die Fehlsteuerung vieler Körperfunktionen, wie z. B. Speichelfluss, Tränenfluss, Tremor, Miose, Diarrhö und schlimmstenfalls Atemprobleme bis hin zum Tod durch Anoxie [147, 163]. Organophosphat-induzierte Hirnvergiftungen sind charakterisiert durch den schnellen Verlust des Bewusstseins, Krämpfe, Hemmung des zentralen Atemzentrums sowie Langzeit-Verhaltensänderungen bei nicht tödlichen Vergiftungen [158]. Die pharmakologische Standard-Behandlung nach OP-Vergiftungen beinhaltet eine Kombination von einem muskarinergen Antagonisten, wie z. B. Atropin, und einem AChE-Reaktivator, den Oximen, wie z.B. Pyridin(2-aldoxim) (PAM) oder Toxogonin (Obidoxim). Obidoxim ist in vielen Ländern als Wirkstoff lizenziert und wird für die Behandlung von Pestizid-Vergiftungen vom OP-Typ, wie Paraoxon, standardmäßig eingesetzt [164]. Die Oxime reaktivieren durch Dephosphorylierung die Funktion der AChE [158]. Von Obidoxim wurde die erfolgreiche Reaktivierung humaner AChE, die durch verschiedene Nervengase inhibiert wurde, gezeigt [165, 166]. Aber Oxime können wegen ihrer chemischen Natur und ihren pharmakokinetischen Eigenschaften die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und erreichen daher die zentralnervösen Kompartimente nicht in therapeutisch ausreichendem Maß [166-172]. Aus diesem Grund können sie generell phosphorylierte AChE nur in der Peripherie und nicht im zentralen Nervensystem reaktivieren.

Daher sind neue Strategien, wie z .B. der nanopartikulär vermittelte Transport, notwendig, um Oxime über die Blut-Hirn-Schranke zu schleusen.

2. Zielsetzung

Die Anforderungen an eine Arzneiform liegen nicht nur in einer möglichst einfachen Herstellung, Schutz des Wirkstoffs und Verbesserung seiner Bioverfügbarkeit, sondern auch besondere Anforderungen wie das spezifische „Drug-Targeting“ und das „Controlled Release“ des Wirkstoffs werden an sie gestellt. Daher ist es ein schon lange verfolgtes Ziel in der Pharmaforschung, Carriersysteme zu entwickeln, die ein gezieltes Transportieren und Freisetzen des Arzneistoffs am Wirkort ermöglichen, um damit unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren und die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern. Ein viel versprechender Ansatz dieses Ziel zu erreichen sind die so genannten nanopartikulären Arzneistoffsysteme.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die präklinische Testung nanopartikulärer Arzneistoffsysteme auf Basis von humanem Serumalbumin, die zum spezifischen Wirkstofftransport entwickelt wurden.

Dabei hatten zwei der zu testenden nanopartikulären Formulierungen das Ziel der **spezifischen Tumor-Chemotherapie** und waren dementsprechend mit einem Zytostatikum beladen und mit einem tumorspezifischen monoklonalen Antikörper als Liganden, zum einen für ein Mammakarzinom-Zellen-Targeting, zum anderen für ein Melanom-Zellen-Targeting, zielgerichtet modifiziert. Ihre zielgerichtete Funktionalität sollte *in vitro* an verschiedenen Target-exprimierenden-Zelllinien untersucht werden. Dabei sollte zunächst deren spezifische zelluläre Bindung und Aufnahme sowie die subzelluläre Verteilung untersucht werden. Weiterhin sollte der intrazelluläre Transport des Wirkstoffes und seine Freisetzung in biologisch aktiver Form gezeigt werden. Hierzu mussten entsprechende Testsysteme individuell entwickelt werden. Dem Antikörper für das Melanom-Zellen-Targeting wurden zusätzlich anti-tumorale Eigenschaften zugesprochen, die bei der Ankopplung an die Nanopartikel-Oberfläche erhalten bleiben sollten. Dies sollte durch *in vitro* entwickelte Assays bestätigt werden.

Zwei weitere Drug-Carrier sollten im Bereich des **Blut-Hirn-Schranken-Targetings** eingesetzt werden und auf ihre Fähigkeit Wirkstoffe über die BHS zu transportieren getestet werden. Mit dem Ligand-modifizierten Wirkstoff-freien System sollte der bis dato nicht vollständig geklärte Aufnahmemechanismus in die Endothelzellen genauer untersucht werden, und mit der Obidoxim-beladenen Formulierung ein Wirkstofftransport über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) in therapeutisch relevantem Maß

gezeigt werden. Dabei mussten für beide Formulierungen die spezifische zelluläre Bindung, Aufnahme und die subzelluläre Verteilung gezeigt werden sowie ihre für ein Blut-Hirn-Schranken-Targeting kompatiblen, untoxischen Eigenschaften. Für die Aufklärung des Transportmechanismus sollte durch geeignete Koinkubations- und Hemmexperimente die Beteiligung einer bestimmten Rezeptor-Familie verifiziert und detaillierter untersucht werden. Bei den Untersuchungen zum Wirkstofftransport sollte ein adäquates *in vitro* BHS-Modell eingesetzt werden, um eine intakte Blut-Hirn-Schranke zu simulieren. Für den Nachweis des tatsächlichen Obidoxim-Transports musste ein auf die biologische Wirkungsweise des Arzneistoffs angepasster Enzym-Assay entwickelt werden.

Durch die präklinischen Untersuchungen sollte insgesamt gezeigt werden, dass nanopartikuläre Drug-Carrier auf Basis von humanem Serumalbumin für einen zielgerichteten Wirkstofftransport geeignet sind.

3. Material und Methoden

Die in den nachfolgend beschriebenen Arbeiten benutzten Chemikalien hatten analytischen Reinheitsgrad. Alle eingesetzten Materialien für das Arbeiten mit Zellkulturen waren vom Hersteller steril verpackt oder durch Autoklavieren sterilisiert worden. Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte unter aseptischen Bedingungen, um Kontaminationen durch Bakterien, Pilze und sonstige Mikroorganismen zu vermeiden. Die eingesetzten Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasmen-Kontamination getestet.

3.1. Nanopartikel zum spezifischen Tumor-Targeting

Die Herstellung der Nanopartikel zum spezifischen Tumor-Targeting und deren physikochemische Charakterisierung hinsichtlich Größe, Gehalt, Beladung, Polydispersität und Zetapotential erfolgte durch Dr. Marion Anhorn im Arbeitskreis von Prof. Dr. Klaus Langer (ehemals am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, jetzt am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster).

3.1.1. Mammakarzinom-Zellen-Targeting

3.1.1.1. Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel

Herstellung der Nanopartikel

Chemikalien

Anti-human-IgG-Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Doxorubicin	Sicor, Rho, Italien
Ethanol 96 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd 25 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Humanes Serumalbumin (Fraktion V)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Iminoethanol (Traut's Reagenz)	Pierce, Rockford, USA
NHS-PEG-Mal, MW 5,0 kDa	Nektar, Huntsville, USA
Reinstwasser (MilliQ-Wasser)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Trastuzumab (Herceptin®)	Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland
Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa®)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

Materialien und Geräte

HPLC-System	
Schnittstelle: D-7000	Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland
Pumpe: D-7120	Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland
Säule: LiChroCART® 250-4 mit LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm)	Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland
Autosampler: D-7200	Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland
Detektor: D-7420, UV/Vis D-7480, Fluoreszenz	Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland
GPC/HPLC-System	
Pumpe: Controller 600	Waters, Eschborn, Deutschland
Säule: TSKgel G30000SW _x 7,8 mm x 30 cm	Tosoh Bioscience, Stuttgart, Deutschland
Autosampler: AS 100	Thermo separation products, Hayward, USA
Detektor: Waters 486 Tunable Absorbance Detector	Waters, Eschborn, Deutschland

Durchführung

Die Nanopartikel (NP) wurden nach einem etablierten Desolvationsverfahren hergestellt [44-46, 54, 173]. Sowohl das humane Serumalbumin (HSA) als auch das Doxorubicin (Dox) wurden in sterilem Wasser gelöst und beide Lösungen wurden vereint. Zur Desolvation wurde zu dieser Lösung unter Rühren Ethanol zugetropft. Es bildeten sich instabile Kolloide, die mittels Glutaraldehyd quervernetzt und damit stabilisiert wurden. Der Gehalt des inkorporierten Doxorubicins konnte quantifiziert werden, indem die Menge des nicht inkorporierten Doxorubicins mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert wurde. Über diese indirekte Bestimmung wurde auf den Doxorubicin-Gehalt der Nanopartikel zurückgerechnet. Für eine kovalente Bindung der Antikörper (AK) an die Partikeloberfläche wurden diese mit 2-Iminoethanol thioliert und die Partikel mit dem NHS-PEG-Mal-Crosslinker aktiviert. In einer Konjugationsreaktion wurde der thiolierte Antikörper an die Oberfläche des aktivierten Nanopartikels gebunden. Für das Mammakarzinom-Zellen-Targeting wurde der monoklonale Antikörper (mAb) Trastuzumab kovalent an die Partikeloberfläche gebunden. Damit entstanden Oberflächen-modifizierte Doxorubicin-beladene Nanopartikel. Durch die Bestimmung des nicht gebundenen Antikörper-Anteils mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) wurde der gebundene Antikörper-Anteil indirekt ermittelt.

Charakterisierung der Nanopartikel

Materialien und Geräte

Exsikkator	VWR, Darmstadt, Deutschland
Malvern Zetasizer 3000 HS _A	Malvern Instruments Ltd., Worcs, UK
Mikrobalancewaage Sartorius Supermicro	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Trockenschrank	Ehret, Emmendingen, Deutschland
Wägeschiffchen	VWR, Darmstadt, Deutschland

Die Partikelgröße (hydrodynamischer Durchmesser) und die Größenverteilung (Polydispersität) der Nanopartikel wurden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ermittelt. Die Bestimmung der Oberflächenladung (Zetapotential) der Nanopartikel beruht auf dem Prinzip der Mikroelektrophorese. Der Gehalt der Nanopartikel wurde über Gravimetrie bestimmt.

3.1.1.2. Zellkultur

Zelllinien

SK-Br-3 (HER2-überexprimierende Mammakarzinom-Zellen)	LGC Promochem, Wesel, Deutschland
MCF-7 (HER2-schwach-exprimierende Mammakarzinom-Zellen)	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

Chemikalien

Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SK-Br-3-Kulturmedium	
McCoy's 5A	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
10 % fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Cölbe, Deutschland
50 U/ml Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
50 µg/ml Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MCF-7-Kulturmedium	
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
10 % fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Cölbe, Deutschland
50 U/ml Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
50 µg/ml Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Materialien und Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Inverses Durchlicht-Mikroskop mit Phasenkontrast- und Fluoreszenzfilter und Dokumentationseinheit	Olympus, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Biberach a. d. Riss, Deutschland
Laminar-Flow Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Sterile Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, Aspirationspipetten)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Sterile Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellzahlbestimmungsgerät „Casy TT“	Innovatis, Reutlingen, Deutschland
Zentrifuge „Biofuge primo R“	Heraeus, Hanau, Deutschland

Kultivierung der Zellen

Die HER2-überexprimierenden Mammakarzinom-Zellen SK-Br-3 und die HER2-schwach-exprimierende Kontroll-Zelllinie MCF-7 wurden in den entsprechenden Kulturmedien bei 37 °C und 7,5 % CO₂ kultiviert. Beide Zelllinien wurden unter Anwendung von Trypsin/EDTA 1 - 2 mal pro Woche von den Zellkulturflaschen abgelöst, für die verschiedenen Versuche auf geeigneten Zellkulturgefäßen ausgesät bzw. in einer Verdünnung von 1:8 - 1:10 weiterkultiviert.

3.1.1.3. Bindungs-Studie**Chemikalien**

PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FACS-Flow, -Clean, -Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS-Fix	
10 g/l PFA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
8,5 g/l NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
in PBS, pH 7,4	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Materialien und Geräte

Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Software CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
24-Loch-Platten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

Durchführung

SK-Br-3-Zellen wurden in 24-Loch-Platten kultiviert und mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen in verschiedenen Konzentrationen, je nach Versuchsdurchführung (genaue Angaben siehe Abschnitt 4.1.1.2.), für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, von den 24-Loch-Platten abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS und der Fixierung der Zellen mit FACS-Fix konnte eine Durchflusszytometrie-Analyse der mit Nanopartikeln inkubierten Zellen durchgeführt werden. Hierzu wurden 10.000 Zellen pro Probe gezählt und mit der Software *CellQuest Pro* ausgewertet. Eine solche Durchflusszytometrie-Analyse der mit Nanopartikeln inkubierten Zellen ist aufgrund der herstellungsbedingten Autofluoreszenz der HSA-Nanopartikeln bei 488/520 nm möglich.

Für Kontroll-Experimente wurden MCF-7-Zellen in 24-Loch-Platten kultiviert und ebenfalls mit den nanopartikulären Formulierungen unter den gleichen Bedingungen wie die SK-Br-3-Zellen behandelt. Die Analyse der Zellen erfolgte, wie oben beschrieben, mittels Durchflusszytometrie.

3.1.1.4. Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung

Chemikalien

Concanavalin A AlexaFluor 350	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Vectashield-HardSet-Mounting-Medium mit DAPI	Axxora, Grünberg, Deutschland

Materialien und Geräte

Argon-Ionen-Laser	Zeiss, Jena, Deutschland
Axiovert 200 M Mikroskope mit 510 NLO Meta System	Zeiss, Jena, Deutschland
2-Kammer-Glasobjektträger	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
LSM Image Examiner Software	Zeiss, Jena, Deutschland
Ti:Sa Femtosekundenlaser	SpectraPhysics, Darmstadt, Deutschland

Durchführung

Die zelluläre Aufnahme und die intrazelluläre Verteilung der Nanopartikel wurden mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie (CLSM) untersucht. Hierzu wurden die

SK-Br-3-Zellen auf 2-Kammer-Glasobjektträgern kultiviert und mit 2 µg/ml der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen (bezogen auf die AK-Konzentration bzw. äquivalente NP-Konzentrationen) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach der vierstündigen Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Zellmembran mit 50 ng/µl des fluoreszenz-markierten Membranfarbstoffs Concanavalin A AlexaFluor 594 für 2 min gefärbt. Die Zellen wurden mit eiskaltem Ethanol für 30 min fixiert, gewaschen und anschließend mit dem Eindeckmedium Vectashield-HardSet-Mounting-Medium, das DAPI zur Kernfärbung enthielt, eingebettet. Die konfokale Raster-Lasermikroskopie-Studie wurde mit einem geeigneten Mikroskop-System und einem Ti:Sa Femtosekunden- oder Argon-Ionen-Laser durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde die LSM Image Examiner Software herangezogen. Für die CLSM-Messungen konnte die durch die Herstellung bedingte grüne Autofluoreszenz der HSA-Nanopartikel bei 488/520 nm genutzt werden.

3.1.1.5. Wirkstoffwiederfindung

Chemikalien, Materialien und Geräte

Die intrazelluläre Wirkstoffwiederfindung wurde mit dem Durchflusszytometer durchgeführt und benötigte dementsprechend alle Chemikalien, Materialien und Geräte wie unter Abschnitt 3.1.1.3. beschrieben.

Durchführung

Die Wiederfindung des intrapartikulär inkorporierten Wirkstoffs Doxorubicin erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierzu wurden SK-Br-3-Zellen in 24-Loch-Platten kultiviert und mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen oder dem freien Wirkstoff in verschiedenen Konzentrationen, je nach Versuchsdurchführung (genaue Angaben siehe Abschnitt 4.1.1.4.), für 4 h bei 37 °C behandelt. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und direkt vermessen oder mit frischem Kulturmedium 20 h bzw. 44 h weiterkultiviert. Anschließend wurden die Zellen von den 24-Loch-Platten abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Eine durchflusszytometrische Analyse wurde nach der Fixierung der Zellen mit FACS-Fix, wie unter Abschnitt 3.1.1.3. beschrieben, durchgeführt. Bei diesem Versuchsaufbau wurde die rote Autofluoreszenz des Doxorubicins bei 488/590 nm genutzt.

3.1.1.6. Biologische Wirksamkeitstestung

Chemikalien

Chloroquin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
WST-1 Tetrazoliumsaz (Cell Proliferation Reagent)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Materialien und Geräte

Fluoreszenz-ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland
6-Loch-Platten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
96-Loch-Platten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

Durchführung

Die biologische Wirksamkeit der nanopartikulären Formulierungen wurde über die Zellviabilität mittels des WST-1-Assays bestimmt. Dieser Assay basiert auf der Absorptionsmessung des gebildeten Formazans, welches durch die Reduktion des Tetrazoliumsazs WST-1 in den Mitochondrien intakter Zellen gebildet wird. SK-Br-3-Zellen wurden hierzu in 6-Loch-Platten kultiviert und mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen, aufgenommen in PBS oder in Chloroquin-haltigem PBS (100 μ M), für 4 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen abgelöst und jeweils 10.000 dieser Zellen pro Kavität einer 96-Loch-Platte ausplattiert und für weitere 7 Tage bei 37 °C kultiviert. Die Zellviabilität wurde nach Zugabe des WST-1-Reagenzes durch Messung des gebildeten Formazans, nach Angaben des Herstellers, bestimmt.

Zur Kontrolle wurde das gleiche Grund-Experiment mit den MCF-7-Zellen durchgeführt. Eine statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Die Unterschiede waren statistisch signifikant bei P -Werten von $P < 0,01$.

3.1.2. Melanom-Zellen-Targeting

3.1.2.1. Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel

Die Nanopartikel wurden, wie unter Abschnitt 3.1.1.1. beschrieben, hergestellt und charakterisiert. Für das Melanom-Zellen-Targeting wurde der monoklonale Antikörper (mAb) DI17E6 (zur Verfügung gestellt von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) kovalent an die Partikeloberfläche gebunden. Bei der Herstellung unbeladener

Nanopartikel wurde während der Synthese kein Doxorubicin zugesetzt, sondern die reine HSA-Lösung als Matrix für den Partikel desolviert und quervernetzt.

3.1.2.2. Nachweis der Antikörper-Modifikation auf der Partikeloberfläche

Die Vorbereitung der Proben für die Raster-Elektronen-Mikroskopie und die Aufnahmen der Bilder wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Alisa Katsen-Globa (Fraunhofer IBMT, Abteilung Biophysik und Kryotechnologie) durchgeführt.

Chemikalien

Kohlegarn (Carbon)	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
18 nm kolloidal Gold anti-human-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Fixierung	
2 % Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
in 0,1 M Natriumcacodylat	Serva, Heidelberg, Deutschland

Materialien und Geräte

SCD-030 Coater	Balzers, Liechtenstein
Feldemissions-Raster-Elektronen-Mikroskop FESEM XL30	Philips, USA
Millipore Filter (0,22 µm)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Millipore Filter Inserts	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Durchführung

Sowohl Nanopartikel mit DI17E6-Oberflächen-Modifikation als auch Nanopartikel ohne Oberflächen-Modifikation wurden für 1 h bei 4 °C mit Gold-markierten anti-human-IgG-Antikörpern inkubiert. Die so markierten Nanopartikel wurden mit 2 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer fixiert und auf Millipore-Filter oder Millipore-Filter-Inserts aufgebracht. In einer Konzentrationsreihe von 30 %, 50 % und 100 % Ethanol wurden die Proben anschließend dehydriert, luftgetrocknet und mittels des SCD-030 Coaters mit Carbon beschichtet. Die Messungen wurden mit einem Feldemissions-Raster-Elektronen-Mikroskop (FESEM XL30) bei einer Beschleunigungsspannung von 10 kV für die Sekundärelektronen (SE)-Bildgebung durchgeführt. Um den Antikörper auf der Partikeloberfläche nachzuweisen, wurde der Rückstreu-Elektronen (BSE)-Modus benutzt.

3.1.2.3. Zellkultur

Zelllinien

M21 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positive Melanom-Zellen	zur Verfügung gestellt von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
M21L α_v -defekte Melanom-Zellen	zur Verfügung gestellt von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Chemikalien

Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
M21/M21L-Kulturmedium	
RPML 1640	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
10 % fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Cölbe, Deutschland
1 % Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
50 U/ml Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Materialien und Geräte

Für die Kultivierung dieser Zellen wurden die unter Abschnitt 3.1.1.2. beschriebenen Materialien und Geräte verwendet.

Kultivierung der Zellen

Die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiven M21-Zellen und die α_v -defekten Kontroll-Zellen M21L wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 in M21/M21L-Kulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden unter Anwendung von Trypsin/EDTA 1 - 2 mal pro Woche von den Zellkulturflaschen abgelöst, für die verschiedenen Versuche auf geeigneten Zellkulturgefäßen ausgesät bzw. in einer Verdünnung von 1:20 - 1:50 weiterkultiviert. Da bei der Bindung von Integrinen an Liganden zweiwertige Ionen eine große Rolle spielen, wurde für alle Versuche mit diesen Zellen PBS mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen benutzt.

3.1.2.4. Bindungs-Studie

Chemikalien, Materialien und Geräte

Die Bindungs-Studie der DI17E6-modifizierten Nanopartikel wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie durchgeführt und benötigte dementsprechend die unter Abschnitt 3.1.1.3. beschriebenen Chemikalien, Materialien und Geräte.

Durchführung

Sowohl M21-Zellen als auch M21L-Zellen wurden in 24-Loch-Platten kultiviert und mit 2 µg/ml der verschiedenen unbeladenen oder Doxorubicin-beladenen nanopartikulären Formulierungen für 4 h bei 37 °C behandelt. Die eingesetzte NP-Menge ist bezogen auf die DI17E6-Konzentration bzw. äquivalente NP-Mengen. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Nach weiteren Waschschritten mit PBS und der Fixierung der Zellen mit FACS-Fix konnte eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen, wie unter Abschnitt 3.1.1.3. beschrieben, durchgeführt werden.

3.1.2.5. Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung

Konfokale Raster-Lasermikroskopie

Chemikalien

Concanavalin A AlexaFluor 350	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Vectashield-HardSet-Mounting-Medium	Axxora, Grünberg, Deutschland
Vectashield-HardSet-Mounting-Medium mit DAPI	Axxora, Grünberg, Deutschland

Materialien und Geräte

Argon-Ionen-Laser	Zeiss, Jena, Deutschland
Axiovert 200 M Mikroskop mit 510 NLO Meta System	Zeiss, Jena, Deutschland
2-Kammer-Glasobjektträger	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
LSM Image Examiner Software	Zeiss, Jena, Deutschland
Ti:Sa Femtosekundenlaser	SpectraPhysics, Darmstadt, Deutschland

Durchführung

Die zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der Nanopartikel wurde mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie (CLSM) untersucht. Hierzu wurden die M21-Zellen auf 2-Kammer-Glasobjektträgern kultiviert und mit 2 µg/ml oder 10 µg/ml der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen (bezogen auf die AK-Konzentration bzw. äquivalente NP-Konzentration) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Zellmembran mit 50 ng/µl des fluoreszenzmarkierten Membranfarbstoffs Concanavalin A AlexaFluor 350 für 2 min gefärbt. Die Zellen wurden mit eiskaltem Ethanol für 30 min fixiert, gewaschen und anschließend mit dem Eindeckmedium Vectashield-HardSet-Mounting-Medium eingebettet, das optional DAPI zur Kernfärbung enthielt. Die konfokale Raster-Lasermikroskopie-Studie wurde, wie unter Abschnitt 3.1.1.4. beschrieben, durchgeführt.

In einer weiteren CLSM-Studie wurde die unterschiedliche Anregbarkeit von zelleigenen und intrazellulär aufgenommenen Fluorochromen bei 488 nm, 750 nm und 960 nm genutzt. Hierzu wurden M21-Zellen auf 2-Kammer-Glasobjektträgern kultiviert und mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium ausgetauscht und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ lebend vermessen.

Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse

Die Datenerfassung der Fluoreszenz-Lebenszeiten wurden in Zusammenarbeit mit Daniel Sauer (Fraunhofer-IBMT, Abteilung Biophysik und Kryotechnologie) durchgeführt.

Materialien und Geräte

Detektor: PMC100	Becker & Hickl, Berlin, Deutschland
2-Kammer-Glasobjektträger	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Raster-Lasermikroskop	Tau-Map, Jenlab GmbH, Jena, Deutschland
Software: SPCImage	Becker & Hickl, Berlin, Deutschland
Ti:Sa Femtosekundenlaser	SpectraPhysics, Darmstadt, Deutschland

Durchführung

Die zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der Nanopartikel wurde ebenfalls mit der Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse (FLIM) untersucht. Das Prinzip

dieser Methode beruht darauf, dass jeder Stoff nach Anregung durch ein oder mehrere Photonen in einen höheren Energiezustand eine andere Abklingzeit der Fluoreszenz-Intensität hat. Die Abklingzeit ist die Lebenszeit des angeregten Zustands der Moleküle. Aus den Eigenschaften des Fluoreszenzlichts und der Lebenszeit lassen sich Rückschlüsse auf die Moleküle, also den Stoff, und auf die Mikroumgebung ziehen. Voraussetzung ist allerdings die Anregbarkeit des Wirkstoffes selbst oder eine Veränderung der Umgebung. Dadurch könnte es theoretisch möglich sein, die Nanopartikel innerhalb der Zelle zu lokalisieren und eine Freisetzung des Wirkstoffes aus dem Partikelsystem in der Zelle nachzuweisen. Hierzu wurden die M21-Zellen auf 2-Kammer-Glasobjektträgern kultiviert und mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium ausgetauscht und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ lebend vermessen. Die FLIM-Studie wurde mit einem Raster-Laser-mikroskop durchgeführt, das mit einem PMC100 Detektor und einem Ti:Sa Femtosekundenlaser ausgestattet war. Zur Auswertung der Daten wurde die SPCImage-Software herangezogen. Dabei wurde ein biexponentielles Fit-Modell zugrunde gelegt.

3.1.2.6. Biologische Wirksamkeitstestung

Zell-Attachment-Assay und Zell-Detachment-Assay

Chemikalien

BSA	PAA, Cölbe, Deutschland
BSA hitzeinaktiviert (20 min, 70 °C)	PAA, Cölbe, Deutschland
CyQUANT GR	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Vitronectin	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Cell Adhesion Medium	
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
2mM L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
1 % BSA	PAA, Cölbe, Deutschland

Materialien und Geräte

ELISA-96-Loch-Platten	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Fluoreszenz-ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland

Durchführung

Für den Zell-Attachment- und den Zell-Detachment-Assay wurden ELISA-96-Loch-Platten mit 1 µg/ml Vitronektin (VN) für 1 h bei 37 °C beschichtet. Anschließend wurde für 30 min mit 1 % hitzeinaktiviertem BSA blockiert. Die Partikelinkubation erfolgte beim Zell-Attachment-Assay zusammen mit den Zellen in „Cell Adhesion Medium“. Es wurden jeweils 2 µg/ml freier DI17E6-Antikörper oder Nanopartikel entsprechend der AK-Konzentration eingesetzt. Nach 1 h Inkubationszeit bei 37 °C wurden nicht adhärenzte Zellen durch vorsichtiges Waschen mit vorgewärmtem PBS entfernt. Die zurückgebliebenen angehafteten Zellen wurden mit CyQUANT GR gefärbt und mit dem Fluoreszenz-ELISA-Reader gegen unbehandelte Zellen, entsprechend den Angaben des Herstellers, ausgezählt.

Für den Zell-Detachment-Assay konnten die Zellen in „Cell Adhesion Medium“ nach der Blockierung mit 1 % hitzeinaktiviertem BSA für 1 h auf der Zellkulturoberfläche anwachsen. Danach wurden 4 µg/ml oder 10 µg/ml freier DI17E6-Antikörper oder Nanopartikel entsprechend der AK-Konzentration zugegeben und für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert, um ein Ablösen der Zellen von der Oberfläche zu induzieren. Die Auszählung der verbliebenen angehafteten Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

Die Verhinderung der Anhaftung der Zellen bzw. das Ablösen der Zellen wurde gegen unbehandelte Kontroll-Zellen ausgezählt. Das Anhaften von Zellen auf nur mit BSA-beschichteten Oberflächen wurde als unspezifischer Hintergrund subtrahiert.

Eine statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Die Unterschiede waren statistisch signifikant bei P -Werten von $P < 0,01$.

Kinetik der Zell-Ablösung

Chemikalien, Materialien und Geräte

Für eine Kinetik der Zell-Ablösung waren die gleichen Chemikalien, Materialien und Geräte notwendig wie für den Zell-Detachment-Assay. Zusätzlich wurden folgende Materialien und Geräte benötigt:

8-Kammer-Glasobjektträger	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Mikroskop IX81 mit Klimakammer	Olympus, Hamburg, Deutschland

Durchführung

In einer parallelen Studie wurde die Kinetik der Zell-Ablösung in VN-beschichteten 8-Kammer-Glasobjektträgern untersucht. Hierzu wurden M21-Zellen mit den unterschiedlichen nanopartikulären Formulierungen oder freiem Doxorubicin in einer befeuchteten, CO₂-begasten Klimakammer bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde über 1 - 2 Tage hinweg mit Durchlichtzeitrafferaufnahmen beobachtet. Dabei wurden im Abstand von 7 Minuten kontinuierlich Aufnahmen aufgezeichnet. Diese Daten wurden manuell ausgewertet.

Zellviabilitäts-Assay

Der Zellviabilitäts-Assay wurde von Florian Rothweiler im Arbeitskreis von Prof. Dr. Jindrich Cinatl am Institut für Medizinische Virologie des Universitätsklinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main durchgeführt.

Chemikalien

MTT-Assay-Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
1 g MTT-Reagenz gelöst in 500 ml PBS	
SDS-Lösung	MP biomedical GmbH, Eschwege, Deutschland
200 g SDS in 1 l DMF/dH ₂ O (1:1)	

Materialien und Geräte

96-Loch-Platten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
TECAN genios Spektralphotometer	TECAN, Crailsheim, Deutschland

Durchführung

Die Zellviabilität wurde in 96-Loch-Platten über den MTT-Assay [174], modifiziert nach Michaelis et al. [175], bestimmt. Sowohl M21-Zellen als auch M21L-Zellen wurden für 5 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen sowie mit freiem Doxorubicin und freiem DI17E6-mAb inkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen lagen in einem Bereich von 0,78 ng/ml – 100 ng/ml bezogen auf die Doxorubicin-Beladung, freies Doxorubicin bzw. freier DI17E6-mAb. Nach dieser Inkubationszeit wurde das MTT-Assay-Reagenz für 4 h zu den Zellen gegeben und anschließend mit 100 µl SDS-Lösung umgesetzt. Die 96-Loch-Platten wurden in einem Spektralphotometer bei 560 nm und einer Referenzwellenlänge von

620 nm ausgelesen. Die Änderung der Zellviabilität wurde als relative Änderung der optischen Dichte im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt.

Die IC₅₀-Werte wurden mit dem Programm CalcuSyn entsprechend berechnet.

3.2. Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Die Herstellung der Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und deren physikochemische Charakterisierung hinsichtlich Größe, Gehalt, Beladung, Polydispersität und Zetapotential erfolgten durch Anja Zensi und Jürgen Kufleitner im Arbeitskreis von Prof. Dr. Jörg Kreuter am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

3.2.1. Apolipoprotein-modifizierte unbeladene Nanopartikel: Aufklärung des Transportmechanismus über die Blut-Hirn-Schranke

3.2.1.1. Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel

Herstellung der Nanopartikel

Chemikalien

Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa®)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Ethanol 96 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd 8 %	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Humanes Serumalbumin (Fraktion V)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
2-Iminoethanol (Traut's Reagenz)	Pierce, Rockford, USA
Mal-PEG-NHS	RAPP Polymere GmbH, Tübingen, Deutschland
mPEG-SPA-5000	Nektar, Huntsville, USA
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
rekombinantes Apolipoprotein E3	zur Verfügung gestellt von Dr. Tikva Vogel (Biotechnology General, Rehovot, Israel)

Durchführung

Die Nanopartikel wurden nach einem etablierten Desolvationsverfahren hergestellt [45, 46]. Das HSA wurde in 10 mM NaCl-Lösung gelöst und mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Zur Desolvation wurde zu dieser Lösung unter Rühren Ethanol zugetropft. Es bildeten sich instabile Kolloide, die mittels Glutaraldehyd quervernetzt und damit stabilisiert wurden. Zur Anknüpfung des Apolipoproteins an die Partikel-

oberfläche wurde das Apolipoprotein mit 2-Iminothiolan thioliert und die Partikel mit einem bifunktionalen PEG-Crosslinker aktiviert. In einer Konjugationsreaktion reagierten die aktivierten Nanopartikel mit dem thiolierten Apolipoprotein zu den kovalent gebundenen Oberflächen-modifizierten Nanopartikeln [137]. Kontrollpartikel ohne Oberflächen-Modifikation wurden mit einem mPEG-Crosslinker hergestellt, der über eine nicht reaktive Methoxygruppe an dem Partikel-abgewandten Ende verfügt.

Charakterisierung der Nanopartikel

Die Nanopartikel für die Transportmechanismus-Studien des Blut-Hirn-Schranken-Targetings wurden analog den Nanopartikeln für das spezifische Tumor-Targeting charakterisiert (siehe Abschnitt 3.1.1.1.).

3.2.1.2. Zellkultur

Zelllinien

bEnd3 (Maus-Gehirnendothelioma-Zellen)	LGC Promochem, Wesel, Deutschland
--	-----------------------------------

Chemikalien

Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
bEnd3-Kulturmedium	
DMEM high glucose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
10 % fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Cölbe, Deutschland
Kollagen IV-Stocklösung (0,5 mg/ml)	
Kollagen IV gelöst in Essigsäure (0,25 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kollagen IV-Beschichtungslösung (0,1 mg/ml)	
Kollagen IV-Stocklösung verdünnt 1:5 mit PBS	

Materialien und Geräte

Für die Kultivierung dieser Zellen wurden die gleichen Materialien und Geräte wie unter Abschnitt 3.1.1.2. beschrieben verwendet.

Kultivierung der Zellen

Die bEnd3-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in bEnd3-Medium kultiviert. Dazu wurden die Zellen unter Anwendung von Trypsin/EDTA 1 - 2 mal pro Woche von den Zellkulturflaschen abgelöst und in einer Verdünnung von 1:6 - 1:15 weiterkultiviert bzw. für die verschiedenen Versuche auf geeigneten Kollagen IV-beschichteten Zellkulturgefäßen ausgesät. Für die Beschichtung wurden 17-18 µg Kollagen IV pro cm² Wachstumsfläche für 2 h bei 37 °C aufgebracht. Anschließend wurde die Fläche einmal mit PBS gewaschen und sofort für die Versuche eingesetzt.

3.2.1.3. Bindungs-Studie

Chemikalien, Materialien und Geräte

Die zelluläre Bindung der Apolipoprotein-modifizierten unbeladenen Nanopartikel wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie untersucht und benötigte dementsprechend alle Chemikalien, Materialien und Geräte wie unter Abschnitt 3.1.1.3. beschrieben.

Durchführung

Die bEnd3-Zellen wurden in Kollagen IV-beschichteten (siehe Abschnitt 3.2.1.2.) 24-Loch-Platten kultiviert bis ein postkonfluenten Monolayer gewachsen war. Anschließend wurden diese Zellen mit 0,1 mg/ml der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen für 4 h bei 4 °C bzw. 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Nach weiteren Waschschritten mit PBS und der Fixierung der Zellen mit FACS-Fix konnte eine Durchflusszytometrie-Analyse der Zellen, wie unter Abschnitt 3.1.1.3. beschrieben, durchgeführt werden.

3.2.1.4. Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung

Konfokale Raster-Lasermikroskopie

Chemikalien

CellTracker™Red CMTPX	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DAPI	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Kollagen IV-Lösung zur Beschichtung (siehe Abschnitt 3.2.1.2.)	
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Vectashield-HardSet-Mounting-Medium	Axxora, Grünberg, Deutschland
Vectashield-HardSet-Mounting-Medium mit DAPI	Axxora, Grünberg, Deutschland

Materialien und Geräte

Argon-Ionen Laser	Zeiss, Jena, Deutschland
Axiovert 200 M Mikroskop mit 510 NLO Meta System	Zeiss, Jena, Deutschland
2-Kammer-Glasobjektträger	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
LSM Image Examiner Software	Zeiss, Jena, Deutschland
Ti:Sa Femtosekundenlaser	SpectraPhysics, Darmstadt, Deutschland

Durchführung

Die zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der Nanopartikel wurde mit konfokaler Raster-Lasermikroskopie (CLSM) untersucht. Hierzu wurden die bEnd3-Zellen auf Kollagen IV-beschichteten (siehe Abschnitt 3.2.1.2.) 2-Kammer-Glasobjektträgern kultiviert und mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und das Zytosol wurde mit CellTracker™Red CMTPX nach Angaben des Herstellers gefärbt. Die Zellen wurden mit 0,5 - 1 % PFA für 5 - 10 min fixiert. Dabei wurde der Zellkern entweder parallel mit 1 µg/ml DAPI gefärbt, oder das anschließende Vectashield-HardSet-Mounting-Medium zum Einbetten der Zellen enthielt optional DAPI. Die konfokale Raster-Lasermikroskopie-Studie wurde, wie unter Abschnitt 3.1.1.4., beschrieben durchgeführt.

Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Die Inkubation der Zellen mit den Nanopartikeln und die erste Fixierung dieser Proben haben am Fraunhofer-IBMT stattgefunden. Die weitere Fixierung und Einbettung der Proben sowie die Aufnahmen der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

(TEM)-Bilder erfolgten durch Anja Zensi im Arbeitskreis von Prof. Dr. Jörg Kreuter am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Chemikalien

Araldit	Serva, Heidelberg, Deutschland
Bleicitrat	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
fl. N ₂	
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kollagen IV-Lösung zur Beschichtung (siehe Abschnitt 3.2.1.2.)	
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Osmiumtetroxid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Propylenoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Uranylacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcacodylat-Puffer 0,1M (pH 7,4)	
2,14 g Dimethylarsensäure-Natriumsalz-Trihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
100 ml dH ₂ O	

Materialien und Geräte

Deckgläschen ø 18 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland
Gelatinekapseln	
Leica UltracutS Microtom ausgestattet mit Diamantmesser	Leica, Österreich Diatome, Schweiz
Philips C12 Transmissions-Elektronen-Mikroskop	Philips, USA
Kupfernetzchen	Plano, Deutschland
Pioloform	Plano, Deutschland

Durchführung

Die bEnd3-Zellen wurden auf Kollagen IV-beschichteten (siehe Abschnitt 3.2.1.2.) runden Deckgläschen kultiviert, bis ein postkonfluenten Monolayer gewachsen war. Anschließend wurden diese Zellen mit 1 mg/ml der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit Kulturmedium wurden die Zellen in einem ersten Fixierungsschritt mit 2,5 % Glutaraldehyd in Natriumcacodylat-Puffer für 2 h fixiert, um die Proteinstrukturen quer zu vernetzen. Anschließend wurden die Zellen in einem zweiten Fixierungsschritt mit 1 % Osmiumtetroxid in Natriumcacodylat-Puffer für 2 h fixiert, um die Lipide und Membrane der Zellen zu stabilisieren. Der Wassergehalt der Zellen wurde über eine steigende Ethanolbadreihe durch 96 % Ethanol ersetzt. Anschließend wurde das Medium durch Propylenoxid und durch steigende Propylenoxid:Araldit-Mischungen ersetzt. Danach wurden die Zellen über Nacht mit Propylenoxid:Araldit (1:2) inkubiert und weitere 4 h

mit reinem Araldit [176]. Araldit-gefüllte Gelatinekapseln wurden auf die Deckgläschen gesetzt und konnten über 48 h bei 60 °C auspolymerisieren. Die Deckgläschen wurden anschließend mit flüssigem Stickstoff von dem Aralditblock abgesprengt. Mit Hilfe eines Leica Ultracut Microtoms, das mit einem Diamantmesser ausgestattet war, wurden daraus ultradünne Schnitte (50 nm) angefertigt und auf Pioloform-beschichteten Kupfernetzchen gesammelt. Diese Proben wurden mit 7 % Uranylacetat in verdünntem Methanol für 12 min und mit Bleicitrat für 8 min gefärbt [177]. Ein Philips C12 Transmissions-Elektronen-Mikroskop wurde bei 80 kV für die Aufnahme der Bilder genutzt.

3.2.1.5. Zellviabilitäts-Assay

Chemikalien

WST-1 Tetrazoliumsalz (Cell Proliferation Reagent)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
--	--

Materialien und Geräte

Fluoreszenz-ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland
96-Loch-Platten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

Durchführung

Die Zellviabilität wurde mit dem WST-1-Assay bestimmt. Dieser Assay basiert auf der Absorptionsmessung des gebildeten Formazans, welches durch die Reduktion des Tetrazoliumsalzes WST-1 in den Mitochondrien intakter Zellen gebildet wird. Hierzu wurden die bEnd3-Zellen in Kollagen IV-beschichteten (siehe Abschnitt 3.2.1.2.) 96-Loch-Platten kultiviert und mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellviabilität wurde nach Zugabe des WST-1-Reagenzes durch Messung des gebildeten Formazans nach Angaben des Herstellers bestimmt.

3.2.1.6. Aufnahmemechanismus-Studien

Untersuchungen zum Rezeptorstatus

Chemikalien, Materialien und Geräte

Die Untersuchungen zum Rezeptorstatus wurden ebenfalls mittels Durchflusszytometrie durchgeführt und benötigten dementsprechend alle Chemikalien, Materialien und Geräte wie unter Abschnitt 3.1.1.3. beschrieben. Zusätzlich wurden folgende Chemikalien und Antikörper benötigt:

anti-ApoER (mouse IgG1, intrazellulär)	Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany
anti-LDLR (rabbit monoklonal IgG, intrazellulär)	abcam, Cambridge, UK
anti-Megalin (mouse polyklonal IgG, intrazellulär)	abcam, Cambridge, UK
Kollagen IV-Lösung zur Beschichtung (siehe Abschnitt 3.2.1.2.)	
LRP1704 (rabbit polyklonal, intrazellulär)	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Claus Pietrzik (Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität Mainz, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Molekulare Neurodegeneration, Mainz, Deutschland)
Sekundär-Antikörper Alexa Fluor 488 goat anti- mouse IgG	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sekundär-Antikörper Alexa Fluor 488 goat anti- rabbit IgG	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Permeabilisierungs-Kit	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Ziegenerum	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Durchführung

Die bEnd3-Zellen wurden auf Kollagen IV-beschichteten (siehe Abschnitt 3.2.1.2.) Zellkulturoberflächen kultiviert bis ein postkonfluenter Monolayer gewachsen war. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, gezählt und in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden permeabilisiert, fixiert und mit 5% Ziegenerum geblockt (20 min, 4 °C), bevor sie mit verschiedenen Verdünnungen des Primär-Antikörpers gegen ApoER, Megalin, LDLR oder LRP für 30 min bei 4 °C inkubiert wurden. Danach wurden sie mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit PBS und der Fixierung der Zellen mit FACS-Fix konnte eine Durchflusszytometrie-Analyse, wie unter Abschnitt 3.1.1.3. beschrieben, durchgeführt werden. Zur Antikörper-Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert und ebenfalls analysiert.

Koinkubationsexperimente

Chemikalien, Materialien und Geräte

Die Koinkubationsexperimente wurden mittels Durchflusszytometrie durchgeführt und benötigten dementsprechend alle Chemikalien, Materialien und Geräte wie unter Abschnitt 3.1.1.3. beschrieben. Zusätzlich wurden folgende Chemikalien und Antikörper benötigt:

Kollagen IV-Lösung zur Beschichtung (siehe Abschnitt 3.2.1.2.)	
LDL	Calbiochem (VWR, Darmstadt, Deutschland)
LRP-Dom II und LRP-Dom IV	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Claus Pietrzik (Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität Mainz, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Molekulare Neurodegeneration, Mainz, Deutschland)
RAP	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Claus Pietrzik (Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität Mainz, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Molekulare Neurodegeneration, Mainz, Deutschland)

Durchführung

Die bEnd3-Zellen wurden in Kollagen IV-beschichteten (siehe Abschnitt 3.2.1.2.) 24-Loch-Platten kultiviert bis ein postkonfluenten Monolayer gewachsen war. Anschließend wurden diese Zellen entweder mit 0,1 mg/ml der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen für 4 h bei 37 °C inkubiert oder mit 0,1 mg/ml der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen und 1 mg/ml LDL, 500 nM RAP + 1 mg/ml LDL oder 0,125 mg/ml LRP-Dom II bzw. 0,125 mg/ml LRP-Dom IV koinkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Nach weiteren Waschschritten mit PBS und der Fixierung der Zellen mit FACS-Fix konnte eine Durchflusszytometrie-Analyse der Zellen, wie unter Abschnitt 3.1.1.3. beschrieben, durchgeführt werden.

3.2.2. Apolipoprotein-modifizierte beladene Nanopartikel: gezielter Wirkstofftransport über die Blut-Hirn-Schranke

3.2.2.1. Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel

Chemikalien

Obidoxim Dichlorid	Merck, Darmstadt, Germany zur Verfügung gestellt von PD Dr. Franz Worek (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, München, Deutschland)
--------------------	--

Materialien und Geräte

Thermomixer compact	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
---------------------	--

Durchführung

Die Nanopartikel für die Wirkstofftransport-Studien über die Blut-Hirn-Schranke wurden, wie unter Abschnitt 3.2.1.1. beschrieben, hergestellt. Für eine Inkorporation des Wirkstoffs Obidoxim in die Partikelmatrix wurde jedoch eine Obidoxim-Lösung zu der HSA-Lösung zugesetzt, bevor daraus die HSA-Nanopartikel bei pH 10 synthetisiert wurden. Eine andere Möglichkeit der Beladung der Nanopartikel mit Wirkstoff ist die nachträgliche adsorptive Beladung der Nanopartikel, nachdem diese hergestellt wurden. Hierzu wurden die Nanopartikel mit einer Obidoxim-Lösung über Nacht im Thermomixer bei 20 °C und 600 rpm inkubiert. Diese adsorptive Beladung der Nanopartikel wurde immer direkt vor Testung der Nanopartikel in der Zellkultur am Fraunhofer IBMT durchgeführt.

3.2.2.2. Zellkultur

Isolierung von primären porcinen Gehirnkapillarendothel-Zellen

Chemikalien

DMEM high glucose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Mikrozid	Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland
PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

bFGF-Lösung	
50 µg bFGF	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
50000 U Heparin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
5 ml PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Collagenase II-Lösung	
100 mg Collagenase II	Biochrom, Berlin, Deutschland
60 ml PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dichtegradient (diskontinuierlich)	
13,33 ml Percoll	Biochrom, Berlin, Deutschland
20 ml DMEM high glucose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dichtegradient (kontinuierlich)	
24 ml Percoll	Biochrom, Berlin, Deutschland
15 ml PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dispase II-Lösung	
5 g Dispase II	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
490 ml PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
10 ml HEPES 1 M	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
DNase I-Stocklösung (10 mg/ml)	
100 mg DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
10 ml aqua ad iniectionem	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
DNase I-Gebrauchslösung (0,01 mg/ml)	
5 µl DNase I-Stock-Lösung	
5 ml DMEM high glucose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Erythrozyten-Lyse-Puffer (steril)	
2000 µl Puffer D	
500 µl Earle's Balanced Salt Solution (1x) (frisch vor Gebrauch hergestellt)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Puffer A (steril)	
3,3 M NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
125 mM KCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
20 mM Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
4,4 mM KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2,5 % Glukose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
in dH ₂ O	
Puffer B (steril)	
52 mM MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
13 mM MgSO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
80 mM CaCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
in dH ₂ O	
Puffer C (steril)	
845 mM NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
in dH ₂ O	

Puffer D (steril)	
90 µl Puffer A	
45 µl Puffer B	
22,5 µl Puffer C	
2100 µl dH ₂ O	
(frisch vor Gebrauch hergestellt)	
Transportlösung	
1 % Penicillin/Streptomycin in PBS	

Materialien und Geräte

Hammer	Stoss-Medica Medizintechnik GmbH, Saarbrücken, Deutschland
Köpfe von <i>Sus scrofa domestica</i> (Hausschwein)	zur Verfügung gestellt vom Schlachthof Zweibrücken
Laminar-Flow Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Luftstrom-Haube	Eigen-Anfertigung am Fraunhofer IBMT
Pinzette	Stoss-Medica Medizintechnik GmbH, Saarbrücken, Deutschland
Schlagmesser	Stoss-Medica Medizintechnik GmbH, Saarbrücken, Deutschland
Skalpelle (rund, spitz)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Sterile Pipetten (10 ml, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Thermoschüttler, C24 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Zellsieb (40 µm)	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge, Biofuge stratos Heraeus	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Zentrifuge, Megafuge 3.0R	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland

Durchführung

Primäre porcine Gehirnkapillarendothel-Zellen (pBCEC) wurden nach einem abgeänderten Protokoll der Methode von Zenker et al. [178] isoliert. Frische Köpfe von *Sus scrofa domestica* (Hausschwein) wurden direkt nach der Schlachtung vom Schlachthaus bezogen und am Fraunhofer IBMT im Tier-OP unter einer Luftstrom-Haube unter möglichst sterilen Bedingungen geöffnet. Hierzu wurde der ungeöffnete Schweinekopf vor Beginn der Präparation zur äußerlichen Reinigung mit Mikrocid eingesprüht (Abb.8a). Die Haut mit der Schwarte wurde auf der Stirn kreuzförmig eingeschnitten und vom Knochen gelöst. Ebenso wurden die Kaumusculatur, die Ohren, restliches Gewebe und die Sehnen vom Hinterhaupt bis zum Atlasansatz vom Schädelknochen entfernt. Erst dann wurde der Schädel mit Hilfe eines Schlagmessers geöffnet (Abb.8b) und das Gehirn freigelegt (Abb.8c). Anschließend wurde die äußere harte Hirnhaut (Dura mater) mit der anliegenden Spinnengewebshaut (Arachnoidea mater) durchtrennt und abgelöst (Abb.8d). Das Gehirn wurde durch Abtrennen des Stammhirns aus dem Schädelknochen vorsichtig entnommen (Abb.8e) und in ein Gefäß mit Transport-Lösung bis zur Isolierung der pBCEC

überführt. Die Isolierung der pBCEC aus dem frisch präparierten Gehirn (Abb.8f) erfolgte zeitnah unter einer sterilen Sicherheitswerkbank. Zunächst wurden von dem Gehirn die weiche Hirnhaut (Pia mater) mit oberflächlichen Gefäßen säuberlich entfernt (Abb.8g). Danach wurde die graue Hirnsubstanz gesammelt (Abb.8h), zerkleinert und mit ungefähr demselben Volumen an Dispase II-Lösung aufgefüllt. Dieser primäre enzymatische Verdau bei 37 °C für 70 min (geschüttelt bei 150 rpm) diente der Homogenisierung der Probe und der Freisetzung von Kapillarfragmenten. Anschließend wurden die Kapillarfragmente durch einen diskontinuierlichen Dichtegradienten (30 min, 4 °C, 2.889 x g, ohne Bremse) von den Bindegewebsbestandteilen abgetrennt (Abb.8i). Für eine gute Abtrennung ist hierbei ein Verhältnis von 2/3 diskontinuierlichem Gradient zu 1/3 aufzutrennender Masse sehr wichtig. Der fett-haltige Überstand wurde entfernt und die Kapillarfragmente über dem Pellet, sichtbar als „rote Wolke“ (siehe Pfeil in Abb.8i), vorsichtig in DMEM überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 235 x g (mit Bremse), um restliches Percoll aus der Präparation zu waschen. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet wurde für die Aufarbeitung von 2 Schweinehirnen in 1 ml Collagenase II-Lösung resuspendiert. Bei diesem sekundären enzymatischen Verdau sollten die Gehirnkapillarendothel-Zellen von nicht-endothelialen Zellen getrennt werden, indem die Basallamina und die interzellulären Verbindungen gelöst werden. Diese Collagenase II-Inkubation erfolgte für 20 min bei 37 °C (geschüttelt bei 150 rpm), wobei ein mehrmaliges, zwischenzeitiges, kräftiges Resuspendieren der Probe wichtig war. Um freigesetzte DNA abzubauen und somit ein Zusammenkleben und Verklumpen der Kapillarfragmente zu verhindern, wurde zu dieser Suspension DNase (5 ml für 2 Schweinehirne) für 3 min bei 37 °C gegeben, die Probe dabei geschüttelt und wiederum resuspendiert. Die so vorbereitete Suspension wurde mit DMEM gemischt und durch ein Zellsieb filtriert (Abb.8j). Dabei wurden große makrovaskuläre und unvollständig verdaute mikrovaskuläre Kapillarfragmente abgetrennt und die Zellen weitestgehend vereinzelt. Die erhaltene Zellsuspension wurde bei 4 °C und 603 x g für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 1 ml DMEM aufgenommen. Anschließend wurden die Gehirnkapillarendothel-Zellen von verunreinigenden Fremdzellen durch eine kontinuierliche Dichte-Gradienten-Zentrifugation (20 min, 10 °C, 800 x g, ohne Bremse) abgetrennt. Dieser kontinuierliche Dichte-Gradient musste im Verlauf der Präparation durch Zentrifugieren (45 min, 21 °C, 14.500 x g, ohne Bremse) vor-

breitete werden und wurde bis zum Gebrauch vorsichtig im Kühlschrank gelagert. Die oberste, rosa gefärbte Bande nach Zentrifugation der Proben enthielt die Gehirnkapillarendothel-Zellen (siehe Pfeil in Abb.8k). Diese wurden vorsichtig in PBS überführt, gewaschen und durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 285 x g pelletiert (Abb.8l). Zur Entfernung von Erythrozyten wurde dieses Pellet zweimal in 1 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer aufgenommen, resuspendiert und sofort wieder zentrifugiert (5 min, 4 °C, 115 x g). Anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit DMEM gewaschen, bevor sie für Versuche auf Kollagen IV-beschichteten 24-Loch-Platten, Mehrkammer-Objekträgern oder Transwell-Inserts ausplattiert wurden. Die Kollagen IV-Beschichtung der Zellkulturgefäße erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.1.2. beschrieben.

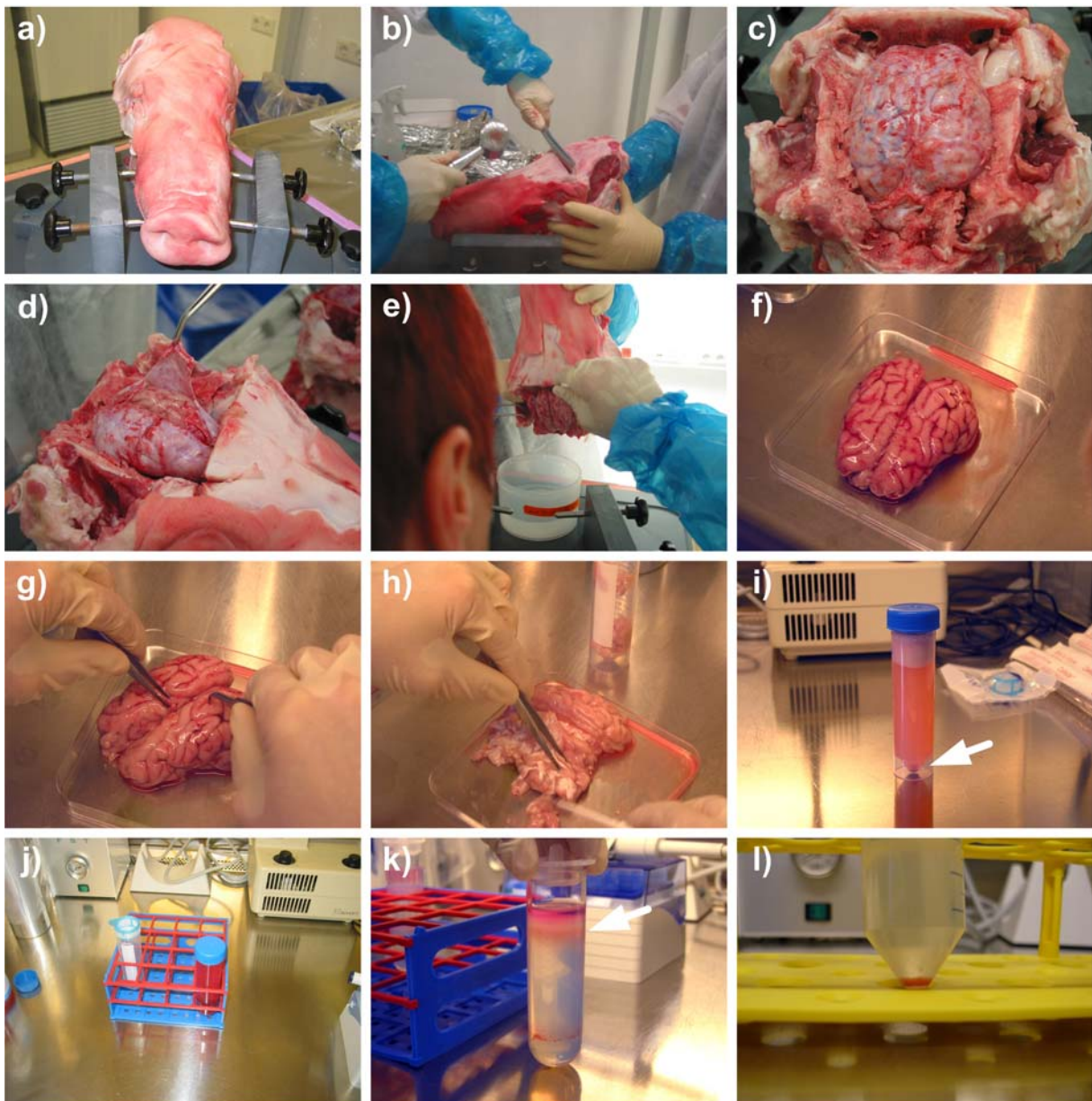


Abb.8 Präparation porciner Gehirnapillarendothel-Zellen (pBCEC).

a) Zur Präparation vorbereiteter fixierter Schweineköpfe. b) Öffnung der Schädeldecke. c) Geöffneter Schädel mit freigelegtem Gehirn. d) Entfernen der äußeren harten Hirnhaut (Dura mater) mit der anliegenden Spinnwebhaut (Arachnoidea mater). e) Herauslösen des Gehirns. f) Frisch präpariertes Schweinehirn. g) Entfernen der weichen Hirnhaut (Pia mater) mit oberflächlichen Gefäßen. h) Sammeln der grauen Hirnsubstanz. i) Gehirnapillar-Fragmente nach Dispase II-Verdau und diskontinuierlicher Dichte-Gradienten-Zentrifugation. j) Abtrennung makrovaskulärer und unverdauter mikrovaskulärer Fragmente nach Collagenase II- und DNase-Verdau mittels Zellsieb. k) Abtrennung von zellulären Verunreinigungen durch kontinuierliche Dichte-Gradienten-Zentrifugation. l) Aus der Präparation erhaltene Gehirnapillarendothel-Zellen.

Kultivierung von primären porcinen Gehirnkapillarendothel-Zellen

Chemikalien

Kollagen IV-Lösung zur Beschichtung (siehe Abschnitt 3.2.1.2.)	
serumhaltiges pBCEC-Medium	
M199	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
10 % Neugeborenen Kälberserum (NCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
0,7 mM L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
100 U/ml Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
100 µg/ml Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
1 % Gentamicin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
serumfreies pBCEC-Medium	
DMEM/F12	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
0,75 % L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
100 U/ml Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
100 µg/ml Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
1 % Gentamicin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
550 nM Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Materialien und Geräte

Für die Kultivierung dieser Zellen waren die gleichen Materialien und Geräte wie unter Abschnitt 3.1.1.2. beschrieben notwendig. Zusätzlich wurden noch benötigt:

24-Loch-Platte	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Mehrkommer-Objektträger	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Transwell-Inserts # 3401	Corning, Wiesbaden, Deutschland

Kultivierung der Zellen

Direkt nach der Isolierung wurden die primären porcinen Gehirnkapillarendothel-Zellen (pBCEC) in serumhaltigem Medium auf Kollagen IV-beschichteten (siehe Abschnitt 3.2.1.2.) 24-Loch-Platten, Mehrkommer-Objektträgern oder Transwell-Inserts bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei Aussaat der Zellen auf Transwell-Inserts erfolgte der erste Mediumwechsel, um Zelltrümmer und nicht angehaftete Zellen zu entfernen, nach 1 h und nach 24 h erfolgte ein weiterer Mediumwechsel. Beim Wachstum auf allen anderen Zellkulturoberflächen erfolgte der Mediumwechsel nach 24 h. Das Medium wurde auf serumfreies Medium umgestellt, sobald die Zellen einen konfluenten Zellrasen bildeten.

Kultivierung von Zelllinien

Die Maus-Gehirnendothelioma-Zellen bEnd3 wurden wie unter Abschnitt 3.2.1.2. beschrieben kultiviert.

3.2.2.3. Bindungs-Studie

Die Bindungs-Studie der Apolipoprotein-modifizierten beladenen Nanopartikel wurde wie für die Apolipoprotein-modifizierten unbeladenen Nanopartikel mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (benötigte Chemikalien, Materialien, Geräte und Durchführung siehe Abschnitt 3.2.1.3.).

3.2.2.4. Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung

Die zelluläre Aufnahme und die intrazelluläre Verteilung der Apolipoprotein-modifizierten beladenen Nanopartikel wurden wie für die Apolipoprotein-modifizierten unbeladenen Nanopartikel mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie (CLSM) untersucht (benötigte Chemikalien, Materialien, Geräte und Durchführung siehe Abschnitt 3.2.1.4.).

3.2.2.5. Zellviabilitäts-Assay

Chemikalien, Materialien und Geräte

Der Einfluss der Apolipoprotein-modifizierten beladenen Nanopartikel auf die Zellviabilität wurde ebenfalls mittels WST-1-Assay bestimmt und benötigte dementsprechend alle Chemikalien, Materialien und Geräte wie unter Abschnitt 3.2.1.5. beschrieben.

Durchführung

pBCEC wurden in Kollagen IV-beschichteten (siehe Abschnitt 3.2.1.2.) 96-Loch-Platten unter denselben Kulturbedingungen wie für die biologische Wirksamkeitstestung (siehe Abschnitt 3.2.2.7.) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen in der gleichen Konzentration wie für die biologische Wirksamkeitstestung (siehe Abschnitt 3.2.2.7.) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellviabilität wurde

nach Zugabe des WST-1-Reagenzes durch Messung des gebildeten Formazans nach Angaben des Herstellers bestimmt.

3.2.2.6. Messung des Transendothelialen elektrischen Widerstands und der Kapazität

Chemikalien

Kollagen IV-Lösung zur Beschichtung (siehe Abschnitt 3.2.1.2.)	
---	--

Materialien und Geräte

cellZscope	nanoAnalytics, Münster, Deutschland
Transwell-Inserts # 3401	Corning, Wiesbaden, Deutschland

Durchführung

Nach der Isolierung der pBCEC wurden 250.000 Zellen direkt auf Kollagen IV-beschichtete (siehe Abschnitt 3.2.1.2.) Transwell-Inserts ausgesät, die in das cellZscope eingesetzt wurden. Dieses Gerät erlaubt die stündliche, vollautomatische Bestimmung des transendothelialen elektrischen Widerstands (TER) und der Kapazität (C_{cl}) der Barriere-ausbildenden pBCEC unter physiologischen Bedingungen mittels Impedanzmessungen.

3.2.2.7. Transport- und Freisetzungs-Studie

Acetylcholinesterase-Assay

Chemikalien

ASCh	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DTNB	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kollagen IV-Lösung zur Beschichtung (siehe Abschnitt 3.2.1.2.)	
Paraoxon-ethyl	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany
Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4)	
Lösung 1: 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 1000 ml dH_2O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lösung 2: 13,6 g KH_2PO_4 in 1000 ml dH_2O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lösung 1 vorlegen und mit Lösung 2 auf pH 7,4 einstellen, anschließend filtrieren	

<i>hypoosmolarer Phosphatpuffer (6,7 mM, pH 7,4)</i>	
1:15 aus Phosphatpuffer mit dH ₂ O	

Materialien und Geräte

Blockthermostat	VWR, Darmstadt, Deutschland
cellZscope	nanoAnalytics, Münster, Deutschland
Dialyseschlauch	BIORON GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
Küvetten	VWR, Darmstadt, Deutschland
Optima L-90 K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, Germany
Plümpfer	Selzer GmbH, Waghäusel, Deutschland
Transwell-Inserts (Polycarbonat-Membran, 0,4 µm Porengröße)	Corning, Wiesbaden, Deutschland
Verdrängungspipetten	Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland

Präparation der Erythrozyten-Geister (humane Acetylcholinesterase)

Humane Acetylcholinesterase (AChE) wurde über die Isolierung hämoglobin-freier Erythrozyten-Geister gewonnen. Dies erfolgte aus heparinisiertem Blut nach der Methode von Dodge et al. [179] mit leichten Veränderungen gemäß Worek et al. [180]. Hierzu wurde heparinisiertes Blut für 10 min bei 3.000 x g zentrifugiert und das Plasma entfernt. Die erhaltenen Erythrozyten wurden mit Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,4) gewaschen, bis der Überstand klar war. Danach wurden die konzentrierten Erythrozyten 1:20 mit hypoosmolarem Puffer (6,7 mM, pH 7,4) verdünnt, um sie zu lysieren. Es folgten zwei bis drei Wasch- und Zentrifugationsschritte bei 50.000 x g (30 min, 4 °C). Anschließend wurden die Erythrozyten-Geister wieder in Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,4) aufgenommen, konzentriert und die Aktivität der so präparierten AChE bestimmt (siehe unten). Aliquote der AChE wurden bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert. Vor jedem Versuch wurde die aufgetaute AChE durch Ultraschall homogenisiert.

Hemmung der humanen Acetylcholinesterase

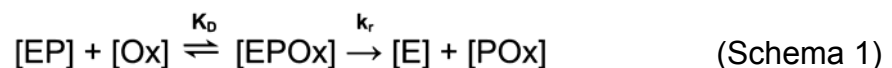
Die AChE wurde durch eine 15-minütige Inkubation mit 100 nM Paraoxon-ethyl bei 37 °C gehemmt. Der Überschuss an Paraoxon-ethyl nach der Hemmung wurde durch eine Dialyse mit Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,4) entfernt. Die Organophosphat (OP)-inhibierte AChE wurde bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert.

Acetylcholinesterase-Enzym-Assay

Für die Testung der biologischen Wirksamkeit der Obidoxim-beladenen nanopartikulären Formulierungen wurden frisch isolierte pBCEC auf Kollagen IV-beschichteten (siehe Abschnitt 3.2.1.2.) Transwell-Inserts ausgesät. Wenn der TER sein Maximum erreicht hatte, wurden die Zellen durch Zugabe der Nanopartikel in das obere, apikale Kompartiment des Transwell-Systems mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach 4 h wurde das Medium aus dem unteren, basolateralen Kompartiment gesammelt, um den Transport und die Freisetzung des Obidoxims über die Reaktivierung von (OP)-inhibierter AChE zu messen [180-182], d. h. zum Zeitpunkt $t = 0$ min wurden hierzu 10 µl Aliquote der gehemmten AChE in vorbereitete Küvetten pipettiert, die Phosphat-Puffer, DTNB und 750 µl des gesammelten Mediums mit dem freigesetzten Obidoxim enthielten. Nach einer Inkubationszeit von $t = 15, 30, 45$ und 60 min bei 37 °C wurde die AChE-Aktivität spektrophotometrisch durch Zugabe von ASCh nach Ellman et al. [183] bestimmt. Die Messung erfolgte bei 37 °C und 412 nm Wellenlänge.

Reaktivierungskinetik

Die Reaktivierung von OP-inhibierter AChE erfolgte nach Worek et al. [180] sowie Aldridge und Reiner [184] gemäß folgendem Schema 1:



In diesem Schema ist [EP] die phosphorylierte AChE, [EPOx] der Phosphyl-AChE-Oxim-Komplex, [Ox] das Oxim, das den Reaktivator darstellt, [E] das reaktivierte Enzym und [POx] das phosphorylierte Oxim. K_D ($= [EP][Ox]/[EPOx]$) ist die Dissoziationskonstante. Diese ist umgekehrt proportional zu der Affinität des Oxims zu [EP]. Die Geschwindigkeitskonstante k_r beschreibt das Ablösen des Phosphyl-Restes von dem [EPOx] durch das Oxim und ist ein Maß für die Reaktivität.

Im Falle einer kompletten Reaktivierung, wenn $[Ox] \gg [EP]_0$, kann, gemäß Gleichung 1, eine Geschwindigkeitsgleichung Pseudo-erster-Ordnung für den Reaktivierungsprozess aufgestellt werden [185].

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_r [\text{Ox}]}{K_D + [\text{Ox}]} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Verwendet man nach Wang und Braid [186] eine diskontinuierliche Methode für die Bestimmung der Enzymaktivität nach verschiedenen Reaktionszeiten, dann können die k_{obs} Werte durch eine lineare Regressionsanalyse gemäß Gleichung 2 berechnet werden:

$$\ln \frac{v_c - v_i}{v_c - v_t} = k_{\text{obs}} \cdot t \quad (\text{Gleichung 2})$$

Diese Gleichung repräsentiert die Aktivität des Kontroll-Enzyms (v_c), des inhibierten Enzyms (v_i) und des reaktivierten Enzyms zum Zeitpunkt t (v_t).

Berechnung der Oxim-Konzentration

Zur Berechnung der transportierten und freigesetzten Oxim-Menge wurden v_c , v_i und v_t mit dem AChE-Enzym-Assay (siehe oben) gemessen. Gemäß Gleichung 2 wurden die \ln -Funktionswerte gegen die Zeitpunkte t in einem Diagramm aufgetragen. Aus der Steigung der erhaltenen Gerade erhält man k_{obs} . Nach Umformung von Gleichung 1 kann daraus gemäß Gleichung 3 die Oxim-Konzentration berechnet werden.

$$[\text{Ox}] = \frac{k_{\text{obs}} \cdot K_D}{k_r - k_{\text{obs}}} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Nach Worek et al. [180] sind bei Verwendung von Paraoxon-ethyl als Inhibitor und Obidoxim als Reaktivator in diesem AChE-Enzym-Assay $K_D = 32,20$ und $k_r = 0,81$.

Für die Berechnung der standardisierten Oxim-Konzentration wurde die Verdünnung des Oxims in der Küvette und im Transwell-System mit einbezogen.

4. Ergebnisse

4.1. Nanopartikel zum spezifischen Tumor-Targeting

Zur Herstellung der Nanopartikel auf der Grundlage von humanem Serumalbumin (HSA) zum spezifischen Tumor-Targeting wurde ein etabliertes Desolvationsverfahren [44-46, 54, 173] eingesetzt, bei dem der Wirkstoff in die Partikelmatrix inkorporiert wurde. Die zielgerichtete Funktionalisierung dieser Nanopartikel erfolgte, wie im Synthese-Schema der Abb.9 dargestellt, durch kovalente Bindung spezifischer Antikörper an die Partikel-Oberfläche.

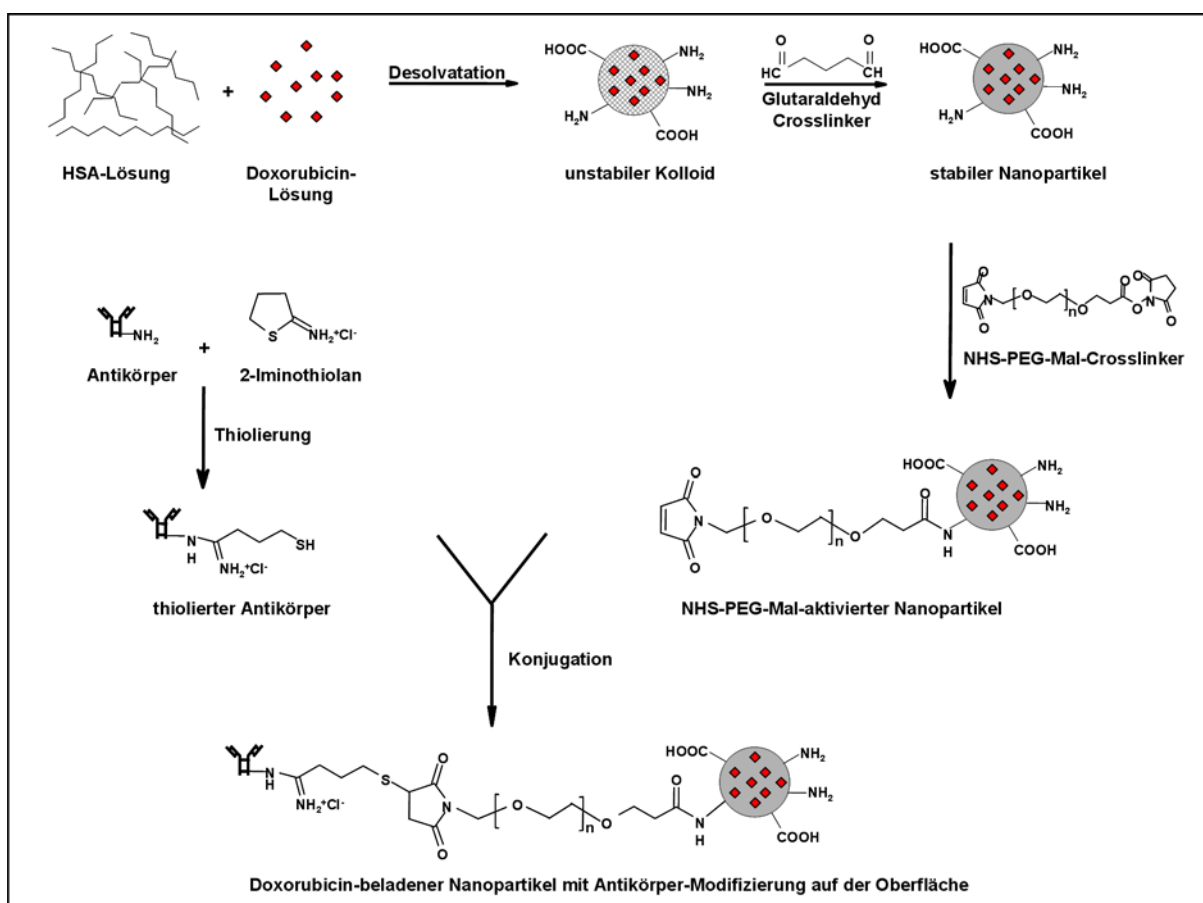


Abb.9 Synthese-Schema Doxorubicin-beladener HSA-Nanopartikel mit Antikörper-Modifikation auf der Partikeloberfläche.

4.1.1. Mammakarzinom-Zellen-Targeting

4.1.1.1. Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel

Die Doxorubicin-beladenen Trastuzumab-modifizierten HSA-Nanopartikel (NP-Dox-Trastuzumab) sowie die dazugehörigen IgG-modifizierten Kontroll-Partikel (NP-Dox-IgG), wurden nach oben beschriebenem Verfahren synthetisiert (Abb.9). Dabei ergab die physikochemische Charakterisierung (Tab.1) eine durchschnittliche Nanopartikelgröße von $385,2 \pm 30,8$ nm für die unmodifizierten Nanopartikel, $395,4 \pm 1,7$ nm für die Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel und $402,2 \pm 6,8$ nm für die IgG-modifizierten Kontroll-Partikel. Die Polydispersität dieser Partikel lag zwischen $0,052 \pm 0,034$ und $0,094 \pm 0,057$ was für eine monodisperse Partikelgrößenverteilung spricht. Die Doxorubicin-Beladung dieser Partikel lag durchschnittlich bei $57,90 \pm 0,44$ µg Wirkstoffbeladung pro mg Nanopartikel. Es wurden $16,09 \pm 3,71$ µg Trastuzumab bzw. $15,39 \pm 3,60$ µg IgG pro mg Nanopartikel an der Oberfläche gebunden. Unabhängig von der Oberflächen-Modifikation zeigten diese Partikel ein Zetapotential zwischen $-42,6 \pm 1,5$ mV und $-46,4 \pm 3,4$ mV.

Tab.1 Physikochemische Charakterisierung der Trastuzumab- und IgG-modifizierten Doxorubicin-beladenen HSA-Nanopartikel.

HSA-Nanopartikel		unmodifiziert	kovalente Bindung von Trastuzumab	kovalente Bindung von IgG
		NP-Dox	NP-Dox-Trastuzumab	NP-Dox-IgG
Partikeldurchmesser	[nm]	$385,2 \pm 30,8$	$395,4 \pm 1,7$	$402,2 \pm 6,8$
Polydispersität		$0,094 \pm 0,057$	$0,080 \pm 0,043$	$0,052 \pm 0,034$
Zetapotential	[mV]	$-42,6 \pm 1,5$	$-46,4 \pm 3,4$	$-43,7 \pm 2,9$
Partikelgehalt	[mg/ml]	$15,37 \pm 0,34$	$14,24 \pm 0,96$	$14,35 \pm 1,13$
Antikörper Bindungseffizienz	[µg/mg]		$16,09 \pm 3,71$	$15,39 \pm 3,60$
Wirkstoffbeladung	[µg/mg]	$57,90 \pm 0,44$	$57,90 \pm 0,44$	$57,90 \pm 0,44$

4.1.1.2. Bindungs-Studie

Zunächst war die spezifische zelluläre Bindung und Aufnahme dieser nanopartikulären Formulierungen in die HER2-überexprimierenden Mammakarzinom-Zellen SK-Br-3 zu klären.

Die zelluläre Bindung der Nanopartikel wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Hierzu wurden SK-Br-3-Zellen sowohl mit den Trastuzumab-modifizierten Doxorubicin-beladenen HSA-Nanopartikeln als auch mit den IgG-modifizierten Kontroll-Partikeln für 4 h bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde die eingesetzte Nanopartikel-Konzentration so gewählt, dass 2 µg/ml Trastuzumab durch die Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel zum Einsatz kamen. Die IgG-modifizierten Kontroll-Partikel wurden in der gleichen Nanopartikel-Konzentration wie die Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel eingesetzt. Die zelluläre Bindung der Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel war, wie in Abb.10a dargestellt, mit 73,80 % positiver Zellen spezifisch. Dagegen zeigten die IgG-modifizierten Nanopartikel mit 5,57 % nur eine geringfügige unspezifische Bindung an die SK-Br-3-Zellen. Wurden diese Zellen mit steigenden Konzentrationen der spezifischen NP-Dox-Trastuzumab (bis zu 20 µg/ml Trastuzumab) inkubiert, stieg der Anteil positiver Zellen auf bis zu 98,43 % an und die mittlere Fluoreszenz verzehnfachte sich annähernd (von 2,27 auf 20,45) (Abb.10b). Bei dem gleichen Experiment mit den unspezifischen IgG-modifizierten Kontroll-Nanopartikeln verdoppelte sich lediglich die mittlere Fluoreszenz von 2,27 auf 4,63 (Daten nicht gezeigt).

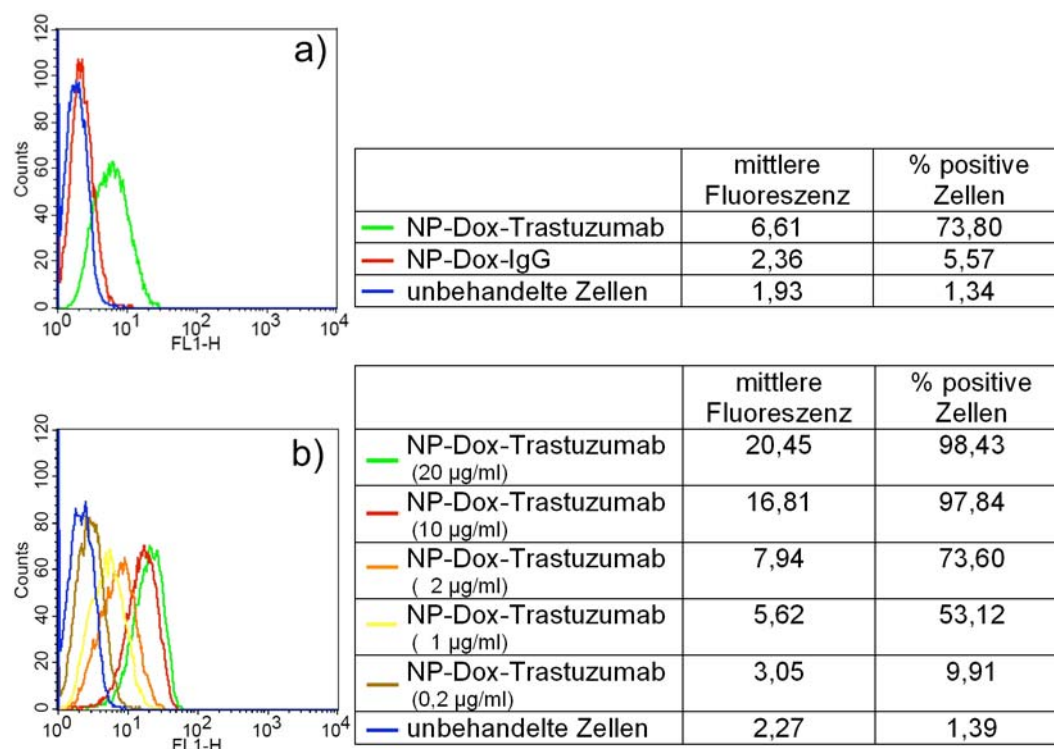


Abb.10 Spezifische zelluläre Bindung Trastuzumab-modifizierter HSA-Nanopartikel an HER2-überexprimierende Mammakarzinom-Zellen SK-Br-3.

a) SK-Br-3-Zellen wurden mit **NP-Dox-Trastuzumab** oder **NP-Dox-IgG** für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die zelluläre Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind sowohl als Histogramme des FL1-H-Kanals (Autofluoreszenzbereich der Nanopartikel) gezeigt als auch als Tabelle mit der mittleren Fluoreszenz und der Prozentzahl positiver Zellen dargestellt. Grün: NP-Dox-Trastuzumab; rot: NP-Dox-IgG; blau: unbehandelte Zellen. **b)** SK-Br-3-Zellen wurden mit **verschiedenen NP-Dox-Trastuzumab Konzentrationen** für 4 h bei 37 °C inkubiert. Eine Durchflusszytometrie-Analyse wurde durchgeführt, um die zelluläre Bindung zu quantifizieren. Die Daten sind sowohl als Histogramme des FL1-H-Kanals (Autofluoreszenzbereich der Nanopartikel) gezeigt als auch als Tabelle mit der mittleren Fluoreszenz und der Prozentzahl positiver Zellen dargestellt. Grün: 20 µg/ml; rot: 10 µg/ml; orange: 2 µg/ml; gelb: 1 µg/ml; braun: 0,2 µg/ml; blau: unbehandelte Zellen (alle Angaben beziehen sich auf die mAb Konzentration).

Als Kontroll-Experiment wurden die Mammakarzinom-Zellen MCF-7 sowohl mit den spezifischen NP-Dox-Trastuzumab als auch mit den unspezifischen Kontroll-Partikeln NP-Dox-IgG inkubiert. Dabei zeigten die Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel wegen der geringeren Expression des HER2-Rezeptors mit 25,02 % positiver Zellen eine geringere Bindung an MCF-7-Zellen als an SK-Br-3-Zellen (Abb.11).

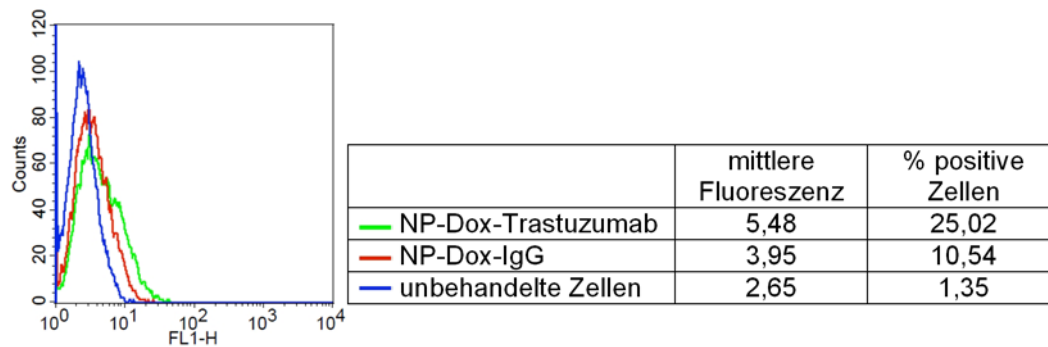


Abb.11 Kontrolle der zellulären Bindung Trastuzumab-modifizierter HSA-Nanopartikel an HER2-schwach-exprimierende Mammakarzinom-Zellen MCF-7.

MCF-7-Zellen wurden mit **NP-Dox-Trastuzumab** oder **NP-Dox-IgG** für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die zelluläre Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind sowohl als Histogramme des FL1-H-Kanals (Autofluoreszenzbereich der Nanopartikel) gezeigt als auch als Tabelle mit der mittleren Fluoreszenz und der Prozentzahl positiver Zellen dargestellt. Grün: NP-Dox-Trastuzumab; rot: NP-Dox-IgG; blau: unbehandelte Zellen.

4.1.1.3. Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung

Die intrazelluläre Aufnahme und die subzelluläre Verteilung der nanopartikulären Formulierungen wurden mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie (CLSM) untersucht. Die SK-Br-3-Zellen wurden sowohl mit Doxorubicin-beladenen (5,96 µg Dox/mg NP) spezifischen Trastuzumab-modifizierten Nanopartikeln (NP-Dox-Trastuzumab) als auch mit unspezifischen IgG-modifizierten Kontroll-Nanopartikeln (NP-Dox-IgG) inkubiert (Abb.12). Während die gelbgrüne Autofluoreszenz der spezifisch aufgenommenen NP-Dox-Trastuzumab im Zellinneren zu erkennen war (Abb.12b), konnten dagegen die unspezifischen Kontroll-Nanopartikel nur außerhalb der Zelle auf der Zellmembran detektiert werden (Abb.12a).

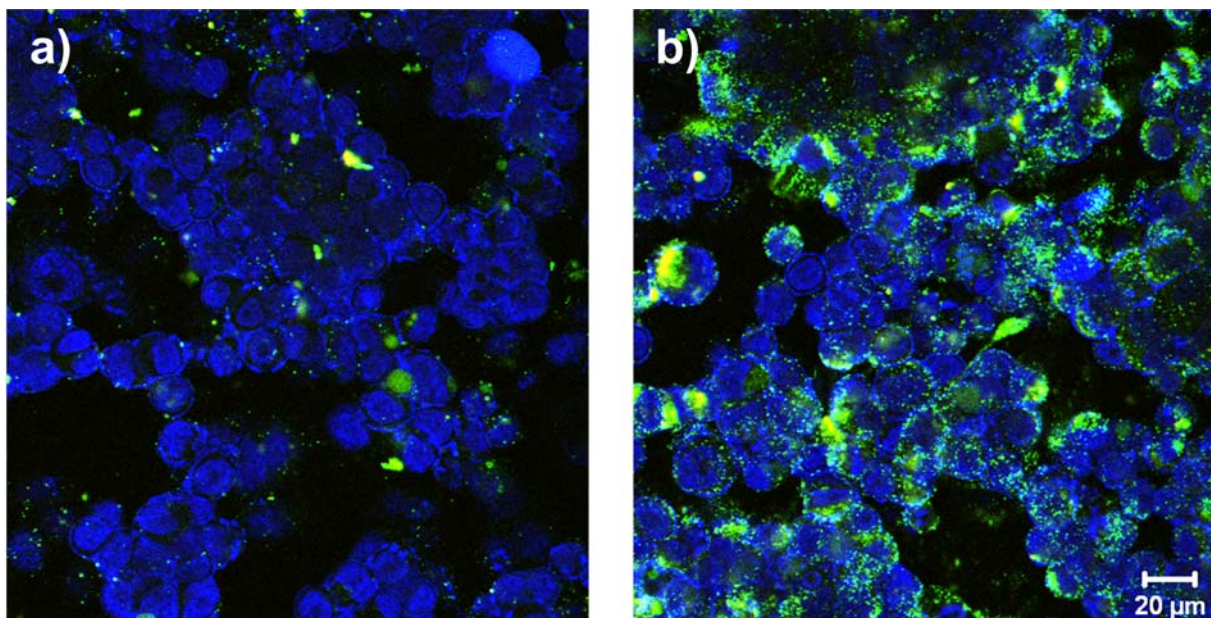


Abb.12 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der Nanopartikel untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie.

SK-Br-3-Zellen wurden mit 2 µg/ml der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen (bezogen auf die Trastuzumab-Konzentration bzw. äquivalente NP-Menge) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die grüne Autofluoreszenz der Nanopartikel und die rote Autofluoreszenz des Doxorubicins wurden für die Detektion genutzt. Die Zellmembran wurde mit Concanavalin A Alexa Fluor 350 (blau) gefärbt. Die Bilder wurden in einer Schnittebene im Inneren der Zelle aufgenommen. **a)** Inkubation der Zellen mit den **unspezifischen NP-Dox-IgG**. **b)** Inkubation der Zellen mit den **spezifischen NP-Dox-Trastuzumab**.

Die intrazelluläre Aufnahme der spezifischen Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel konnte anhand einer vergrößerten CLSM-Aufnahme einer mit NP-Dox-Trastuzumab-inkubierten Zelle verdeutlicht werden (Abb.13a). Die Aufspaltung in die einzelnen Fluoreszenzkanäle (Abb.13b-d) erleichterte und verifizierte die intrazelluläre Lokalisation der Nanopartikel.

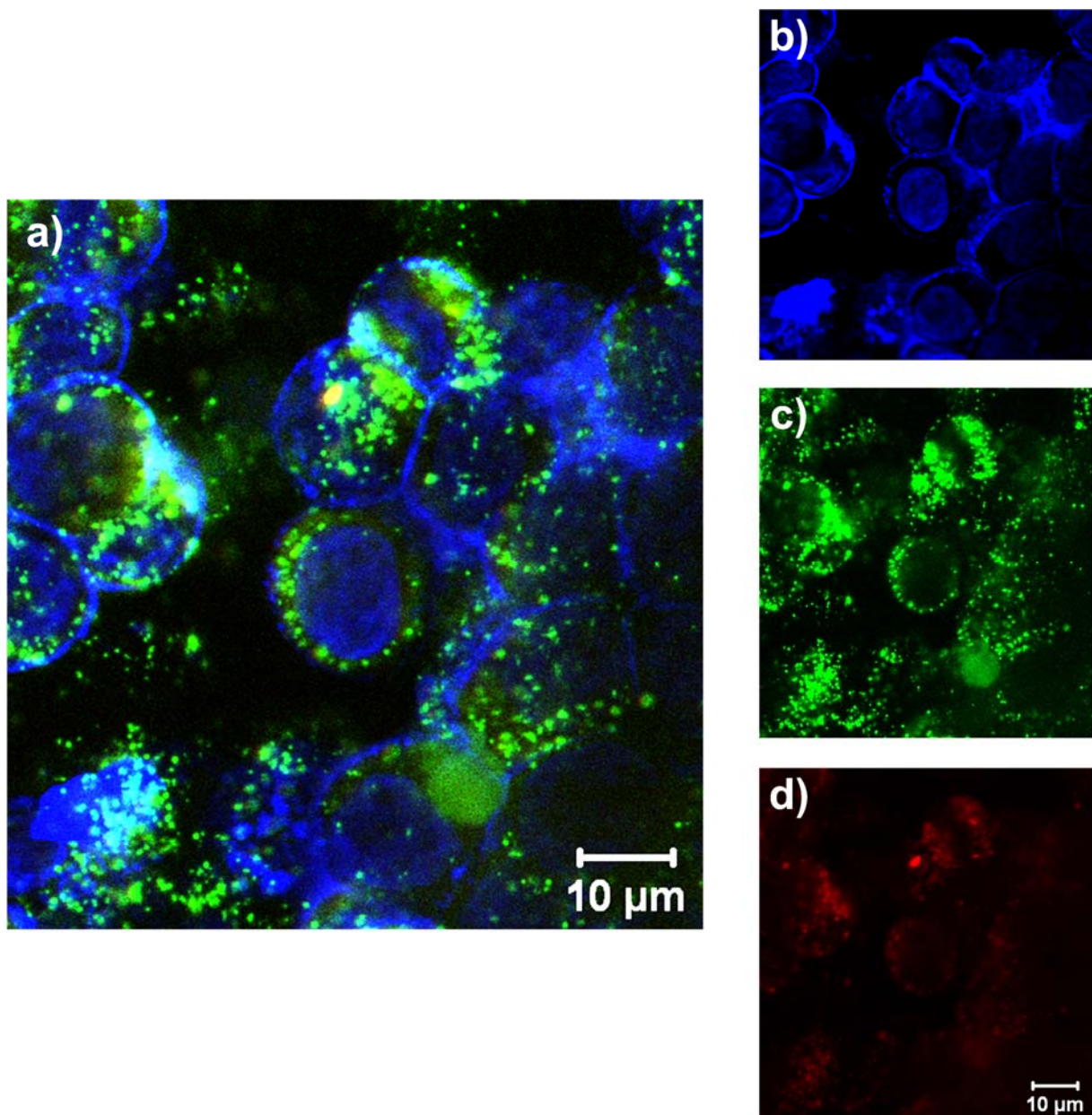


Abb.13 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von NP-Dox-Trastuzumab untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie: Aufspaltung der Fluoreszenzkanäle.

SK-BR-3-Zellen wurden mit 2 µg/ml **NP-Dox-Trastuzumab** (bezogen auf die Trastuzumab-Konzentration) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die grüne Autofluoreszenz der Nanopartikel und die rote Autofluoreszenz des Doxorubicins wurden für die Detektion genutzt. Die Zellmembran wurde mit Concanavalin A Alexa Fluor 350 blau und der Zellkern mit DAPI blau gefärbt. Die Bilder wurden in einer Schnittebene im Inneren der Zelle aufgenommen. **a) Überlagerung aller Fluoreszenzkanäle.** **b)** Blauer Fluoreszenzkanal der **Zellmembran- und Kernfärbung**. **c)** Grüner Fluoreszenzkanal der **Nanopartikel-Autofluoreszenz**. **d)** Roter Fluoreszenzkanal der **Doxorubicin-Autofluoreszenz**.

4.1.1.4. Wirkstoffwiederfindung

In weiteren Versuchen wurde der spezifische Transport des Zytostatikums Doxorubicin mit diesen nanopartikulären Formulierungen in die Krebszellen, dessen Freisetzung und biologische Aktivität überprüft.

In einem ersten Wirkstoffwiederfindungs-Experiment wurde untersucht, ob mittels Durchflusszytometrie verschiedene intrazelluläre Doxorubicin-Konzentrationen zu detektieren und zu unterscheiden sind. Hierzu wurde die rote Autofluoreszenz des Doxorubicins genutzt und im FL2-H-Kanal des Durchflusszytometers gemessen. SK-Br-3-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (1 - 50 μM) des freien, nicht nanopartikulär gebundenen Doxorubicins für 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend vermessen. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Analyse zeigten deutlich, dass eine konzentrationsabhängige Detektion des intrazellulären Doxorubicins mittels Durchflusszytometrie möglich war (Abb.14a).

Wurden die Zellen mit 15 μM (bezogen auf die Doxorubicin-Konzentration) der verschiedenen Doxorubicin-beladenen nanopartikulären Formulierungen oder freiem Doxorubicin für 4 h bei 37 °C inkubiert, so konnten verschiedene Histogramme für die spezifischen Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel, die IgG-modifizierten Kontroll-Nanopartikel und das freie Doxorubicin aufgenommen werden, was für unterschiedliche intrazelluläre Doxorubicin-Konzentrationen und somit für unterschiedliche transportierte Doxorubicin-Mengen sprach (Abb.14b). Freies Doxorubicin zeigte hierbei die größte Fluoreszenz-Intensität, gefolgt von den spezifischen NP-Dox-Trastuzumab und den unspezifischen NP-Dox-IgG.

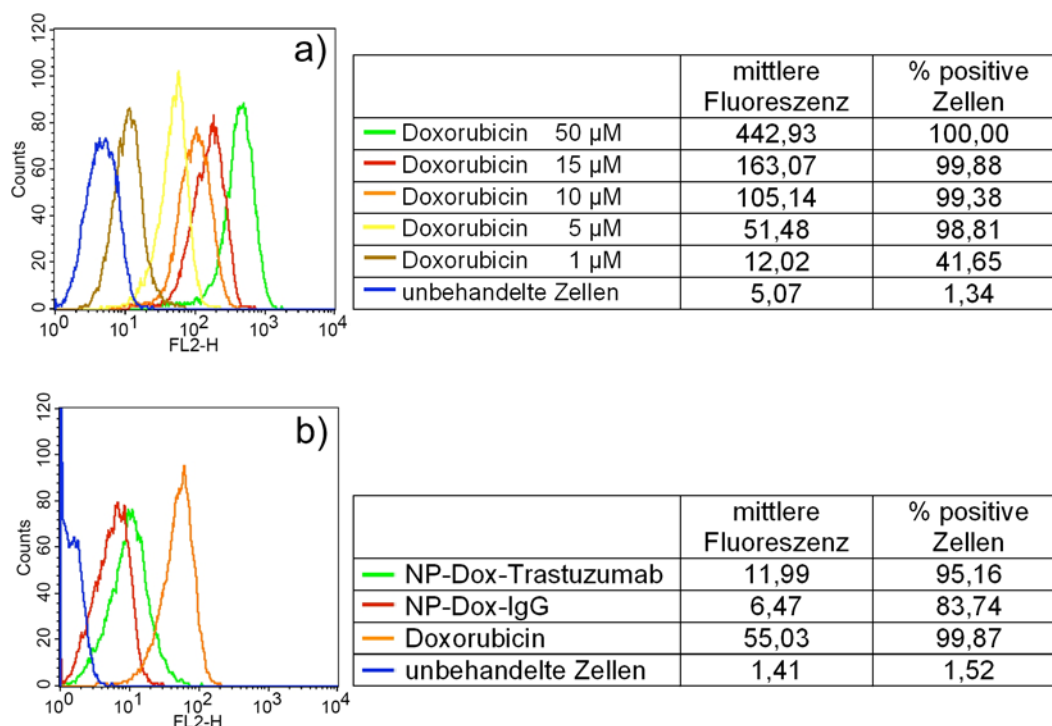


Abb.14 Doxorubicin-Wiederfindung untersucht mittels Durchflusszytometrie: Unterscheidung unterschiedlicher intrazellulärer Doxorubicin-Konzentrationen und Detektion von nanopartikulär transportiertem Doxorubicin.

a) SK-Br-3-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an **freiem Doxorubicin** für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die zelluläre Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind sowohl als Histogramme des FL2-H-Kanals (Autofluoreszenzbereich des Doxorubicins) gezeigt als auch als Tabelle mit der mittleren Fluoreszenz und der Prozentzahl positiver Zellen dargestellt. Grün: 50 µM freies Doxorubicin; rot: 15 µM freies Doxorubicin; orange: 10 µM freies Doxorubicin; gelb: 5 µM freies Doxorubicin; braun: 1 µM freies Doxorubicin; blau: unbehandelte Zellen. **b)** SK-Br-3-Zellen wurden mit **verschiedenen nanopartikulären Formulierungen oder freiem Doxorubicin** für 4 h bei 37 °C inkubiert. Eine Durchflusszytometrie-Analyse wurde durchgeführt, um die zelluläre Bindung zu quantifizieren. Die Daten sind sowohl als Histogramme des FL2-H-Kanals (Autofluoreszenzbereich des Doxorubicins) gezeigt als auch als Tabelle mit der mittleren Fluoreszenz und der Prozentzahl positiver Zellen dargestellt. Orange: freies Doxorubicin; grün: NP-Dox-Trastuzumab; rot: NP-Dox-IgG; blau: unbehandelte Zellen.

Durch unterschiedliche Doxorubicin-Beladung der Nanopartikel war die transportierte Doxorubicin-Menge zu beeinflussen. Hierzu wurden SK-Br-3-Zellen mit den spezifischen NP-Dox-Trastuzumab, die einen intrapartikulären Doxorubicin-Gehalt von 2,78 µg oder 5,96 µg Doxorubicin pro mg Nanopartikel hatten, zu gleichen Nanopartikel-Konzentrationen für 4 h bei 37 °C inkubiert. Das Gleiche galt für die unspezifischen Kontroll-Partikel NP-Dox-IgG. Durchflusszytometrische Messungen im FL1-H-Kanal, der die grüne Autofluoreszenz der Nanopartikel detektierte, bestätigten eine bessere zelluläre Bindung der spezifischen Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel (über 90 % positive Zellen) gegenüber den unspezifischen Partikeln (ungefähr 1,3 % positive Zellen) (Abb.15a). Jedoch war kein Unterschied in der zellulären Bindungseffizienz zwischen den beiden unterschiedlich Doxorubicin-

beladenen NP-Dox-Trastuzumab zu erkennen (Abb.15a). Untersuchungen im FL2-H-Kanal des Durchflusszytometers zeigten einen besseren Doxorubicin-Transport durch die mit Doxorubicin höher beladenen Nanopartikel. Die Nanopartikel mit der doppelten Doxorubicin-Beladung transportierten auch ungefähr doppelt so viel Doxorubicin in die Zelle. Dieser Effekt war sowohl bei den spezifischen als auch bei den unspezifischen Nanopartikeln zu erkennen (Abb.15b).

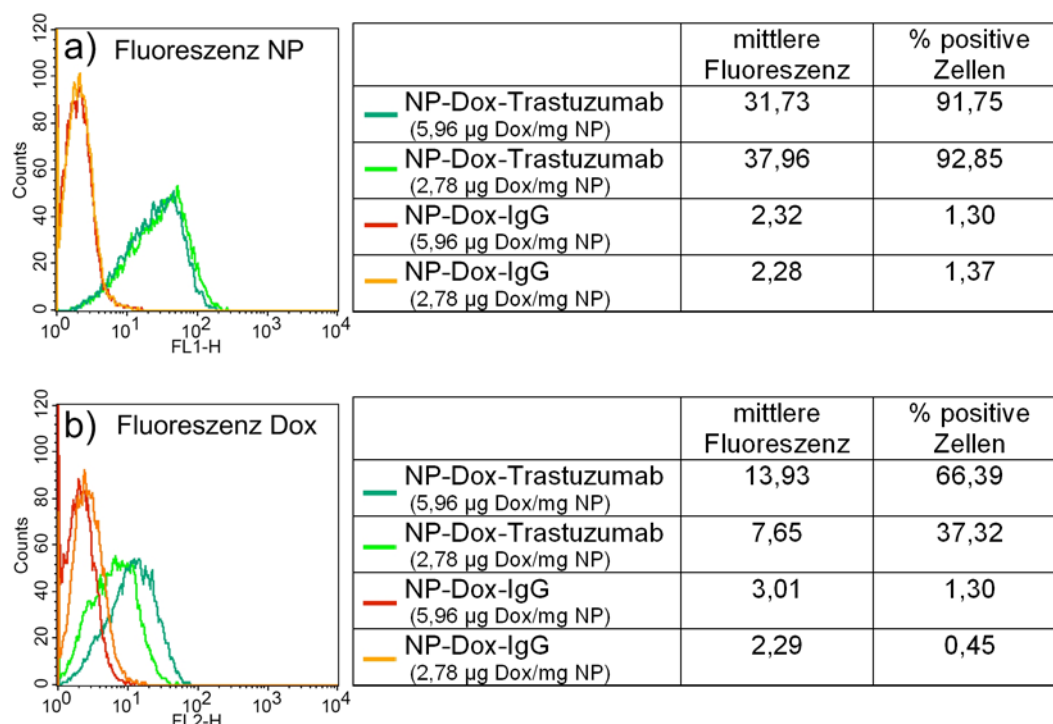


Abb.15 Doxorubicin-Wiederfindung untersucht mittels Durchflusszytometrie.

SK-Br-3-Zellen wurden mit **verschiedenen nanopartikulären Formulierungen** mit unterschiedlichen intrapartikulären Doxorubicin-Konzentrationen für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die zelluläre Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. **a)** Die Daten sind sowohl als Histogramme des FL1-H-Kanals (**Autofluoreszenzbereich der Nanopartikel**) gezeigt als auch als Tabelle mit der mittleren Fluoreszenz und der Prozentzahl positiver Zellen dargestellt. **b)** Die Daten sind sowohl als Histogramme des FL2-H-Kanals (**Autofluoreszenzbereich des Doxorubicins**) gezeigt als auch als Tabelle mit der mittleren Fluoreszenz und der Prozentzahl positiver Zellen dargestellt. Dunkelgrün: NP-Dox-Trastuzumab mit einer intrapartikulären Doxorubicin-Konzentration von 5,96 µg Dox/mg NP; Hellgrün: NP-Dox-Trastuzumab mit einer intrapartikulären Doxorubicin-Konzentration von 2,78 µg Dox/mg NP; rot: NP-Dox-IgG mit einer intrapartikulären Doxorubicin-Konzentration von 5,96 µg Dox/mg NP; orange: NP-Dox-IgG mit einer intrapartikulären Doxorubicin-Konzentration von 2,78 µg Dox/mg NP.

In einem weiteren Wiederfindungs-Experiment sollte die intrazelluläre Doxorubicin-Prozessierung untersucht werden. Dazu wurden SK-Br-3-Zellen mit 7 µM (bezogen auf die Doxorubicin-Konzentration) NP-Dox-Trastuzumab, NP-Dox-IgG oder freiem Doxorubicin für 4 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder direkt mit

dem Durchflusszytometer im FL2-H-Kanal analysiert oder für weitere 20 h bzw. 44 h mit frischem Medium ohne Partikel inkubiert. In Abb.16 sind die Histogramme der jeweiligen Inkubationsvarianten dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit der intrazellulären Doxorubicin-Prozessierung wurden für die Auswertung der Daten zwei Grenzlinien durch die Maxima der Histogramme für freies Doxorubicin und für die spezifischen NP-Dox-Trastuzumab bei der 4 h Inkubation gelegt. Ihre geradlinigen Verlängerungen kreuzen die Histogramme für die 4 h + 20 h- und 4 h + 44 h-Inkubationszeiten und erleichtern damit die Beurteilung der Histogramm-Entwicklung. Es bestätigte sich, wie schon aus den anderen Wiederfindungs-Experimenten bekannt, dass durch die Inkubation mit freiem Doxorubicin zunächst am meisten Doxorubicin in die Zelle transportiert wurde, gefolgt von den spezifischen NP-Dox-Trastuzumab und den unspezifischen NP-Dox-IgG (Abb.16). Wurden die Zellen jedoch mit frischem Medium weiter kultiviert und nach 20 h bzw. 44 h analysiert, so war ein schnellerer Rückgang des Doxorubicin-Signals bei der Inkubation mit freiem Doxorubicin zu erkennen als bei den NP-Dox-Trastuzumab-inkubierten Zellen. Dabei gingen die Werte für die mit freiem Doxorubicin inkubierten Zellen von 65 (im 4 h Histogramm) auf 13 (im 4 h + 44 h Histogramm) zurück, was einem Rückgang um Faktor 5 entspricht. Für das Doxorubicin-Signal der NP-Dox-Trastuzumab-inkubierten Zellen ließ sich ein Rückgang von 13 (im 4 h Histogramm) auf 8 (im 4 h + 44 h Histogramm) ablesen, was einem Faktor von 1,6 entspricht.

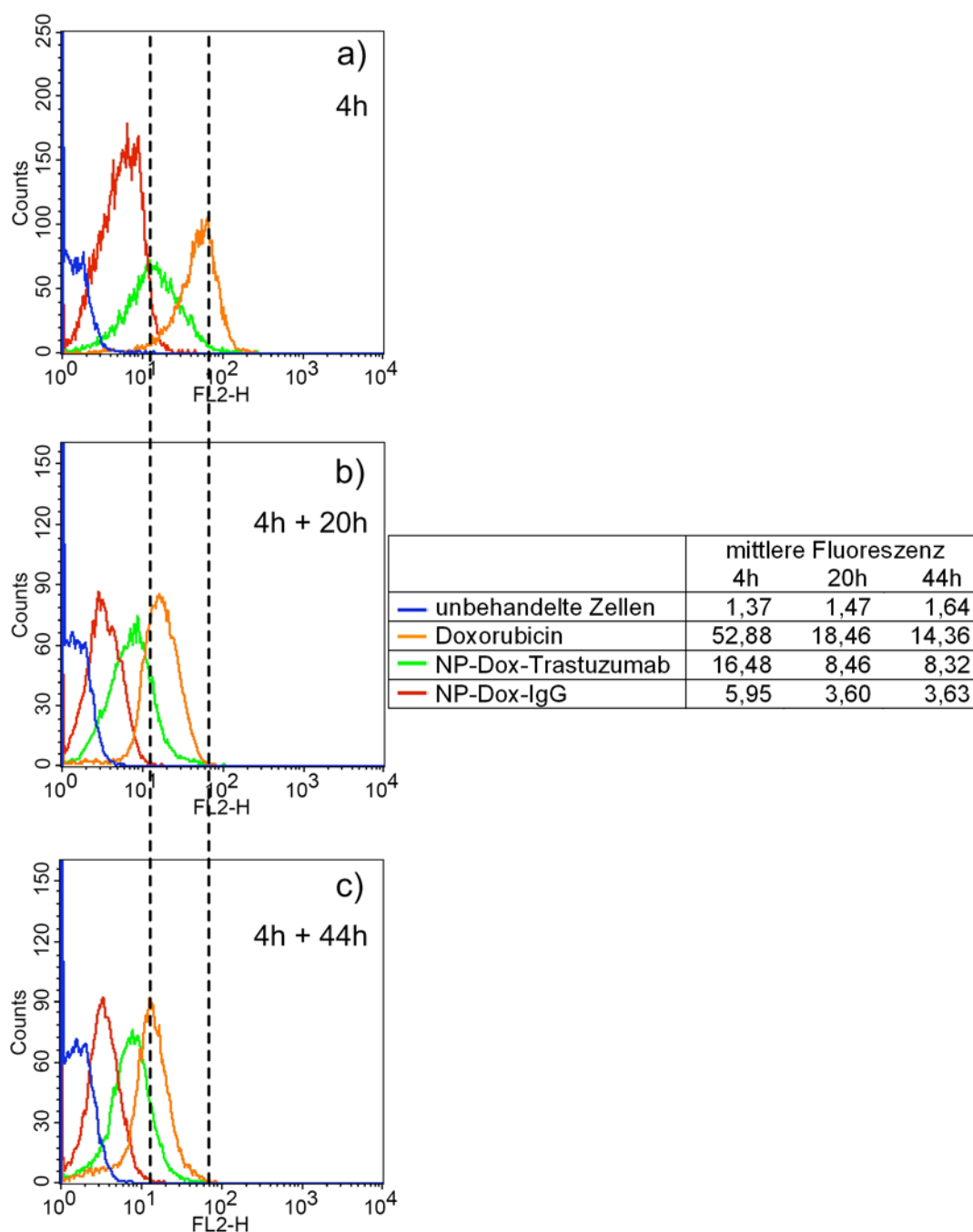


Abb.16 Doxorubicin-Wiederfindung untersucht mittels Durchflusszytometrie: Intrazelluläre Doxorubicin-Prozessierung.

SK-Br-3-Zellen wurden mit **verschiedenen nanopartikulären Formulierungen oder freiem Doxorubicin** für 4 h bei 37 °C behandelt und anschließend mit frischem Zellkulturmedium für verschiedene Zeitperioden inkubiert. Die zelluläre Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind sowohl als Histogramme des FL2-H-Kanals (Autofluoreszenzbereich des Doxorubicins) gezeigt als auch als Tabelle mit der mittleren Fluoreszenz dargestellt. Orange: freies Doxorubicin; grün: NP-Dox-Trastuzumab; rot: NP-Dox-IgG; blau: unbehandelte Zellen. **a) 4 h** Inkubation ohne frisches Zellkulturmedium. **b) 4 h** Inkubation und **20 h** mit frischem Zellkulturmedium. **c) 4 h** Inkubation und **44 h** mit frischem Zellkulturmedium.

4.1.1.5. Biologische Wirksamkeitstestung

Die tatsächliche Freisetzung des Doxorubicins in seiner aktiven Form ließ sich anhand seiner biologischen Wirksamkeit demonstrieren. Diese wurde über die Zellviabilität nach Inkubation mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen mittels des WST-1-Assays bestimmt. Hierzu wurden SK-Br-3-Zellen mit 15 μ M (bezogen auf den Doxorubicin-Gehalt) der spezifischen Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel oder der unspezifischen IgG-modifizierten Kontroll-Partikel für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für sieben weitere Tage in Kultur gehalten, bis die Zellviabilität über Absorptionsmessungen der Formazan-Bildung bestimmt wurde. Diese Formazan-Bildung findet nur in den Mitochondrien intakter Zellen statt. Daher waren bei diesen Versuchen unbehandelte Zellen als Standard festgesetzt. Dies entsprach einer Viabilität von 100 %. Nach der Inkubation mit den NP-Dox-Trastuzumab zeigten die Zellen nur noch eine Viabilität von 20,1 % verglichen zu 56,5 % viabler Zellen nach der Inkubation mit NP-Dox-IgG (Abb.17a). Um zu testen, ob die Nanopartikel im Endosom oder Lysosom fest steckten und daher ihre Zytostatika-Beladung nicht vollständig freisetzen konnten, wurde der gleiche Versuch nochmals in Anwesenheit von Chloroquin durchgeführt. Chloroquin ist eine schwache Base, die schnell in die Zellen diffundiert und in sauren Kompartimenten wie den Endosomen und Lysosomen, akkumuliert. Durch den pH-Anstieg in den Kompartimenten führt dies zu einer Hemmung lysosomaler Enzyme, die nur bei niedrigen pH-Werten arbeiten. Des Weiteren inhibiert Chloroquin die Fusion von Endosomen und Lysosomen, somit können darin aufgenommene Wirkstoffe nicht weiter abgebaut werden. Die Akkumulation von Chloroquin in den endosomalen Vesikeln führt zu deren osmotischem Anschwellen, so dass die Endosome destabilisiert und die sich darin angesammelten Wirkstoffe freigegeben werden. Jedoch war kein deutlicher Unterschied bei der Versuchsdurchführung mit Chloroquin (Abb.17b) im Vergleich zu dem Versuch ohne Chloroquin (Abb.17a) festzustellen. Nach der Inkubation mit NP-Dox-Trastuzumab waren 20,1 % der Zellen viabel, im Vergleich zu der Inkubation in Anwesenheit von Chloroquin mit 19,6 % viabler Zellen. Die Ergebnisse für die Inkubation mit den NP-Dox-IgG waren vergleichbar, 56,5 % viable Zellen nach der herkömmlichen Inkubation und 51,7 % viable Zellen nach Inkubation in Anwesenheit von Chloroquin.

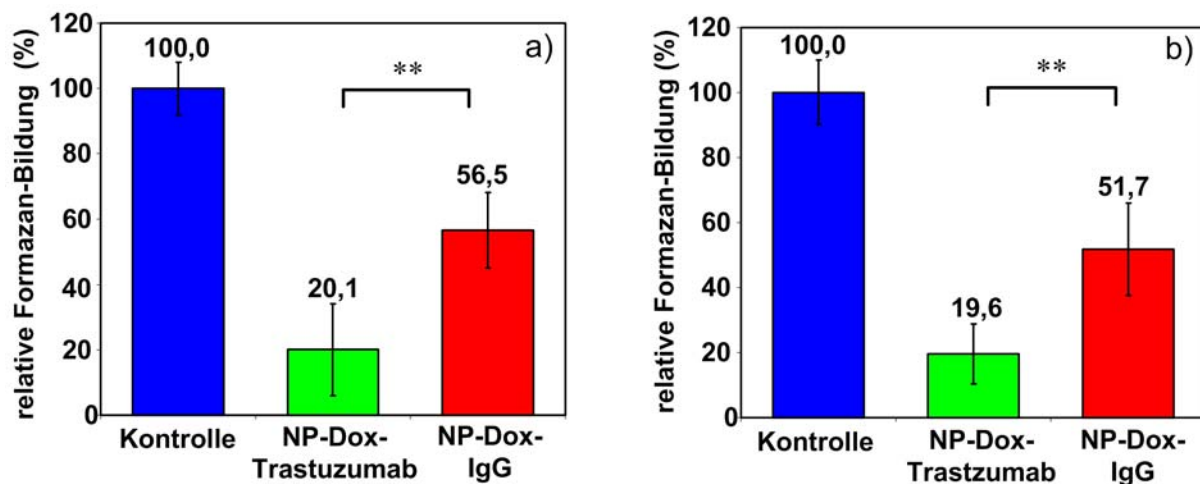


Abb.17 Zellviabilitäts-Assay: Vergleich zwischen NP-Dox-Trastuzumab und NP-Dox-IgG.

SK-Br-3-Zellen wurden mit **NP-Dox-Trastuzumab** oder **NP-Dox-IgG** in gleicher Konzentration in **a) PBS** oder **b) PBS mit Chloroquin** für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen für weitere 7 Tage bei 37 °C kultiviert. Die Zellviabilität wurde nach Zugabe des WST-1-Reagenz durch Messung der Formazan-Bildung bestimmt. Unbehandelte Zellen wurden als Standard auf 100 % gesetzt. **: Die Proben unterscheiden sich signifikant ($P < 0,01$, Mann-Whitney U Test).

Um auszuschließen, dass die biologische Aktivität von dem an der Partikel-Oberfläche gekoppelten Trastuzumab induziert war, wurden Vergleichsexperimente zwischen Doxorubicin-beladenen Trastuzumab-modifizierten und unbeladenen Trastuzumab-modifizierten Nanopartikeln durchgeführt. Wie schon in den vorherigen Experimenten gesehen, hatten die Doxorubicin-beladenen Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel mit 20,2 % positiver Zellen einen Einfluss auf die Zellviabilität, die unbeladenen Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel dagegen nicht (94,0 % positive Zellen) (Abb.18).

Um die Spezifität dieses nanopartikulären Systems zu demonstrieren, wurden als Kontroll-Experiment die HER2-schwach-exprimierenden MCF-7-Zellen sowohl mit den spezifischen Trastuzumab-modifizierten Nanopartikeln als auch mit den unspezifischen IgG-modifizierten Nanopartikeln inkubiert. Beide nanopartikuläre Formulierungen zeigten den gleichen unspezifischen Einfluss auf die Zellviabilität (Abb.19).

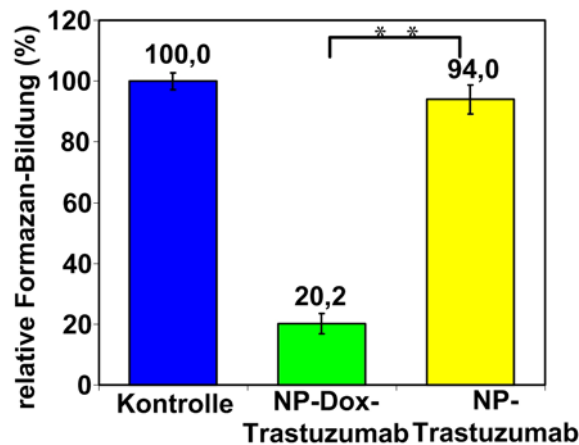


Abb.18 Zellviabilitäts-Assay: Vergleich zwischen NP-Dox-Trastuzumab und NP-Trastuzumab. SK-Br-3-Zellen wurden mit **NP-Dox-Trastuzumab** oder **NP-Trastuzumab** in gleicher Konzentration für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen für weitere 7 Tage bei 37 °C kultiviert. Die Zellviabilität wurde nach Zugabe des WST-1-Reagenz durch Messung der Formazan-Bildung bestimmt. Unbehandelte Zellen wurden als Standard auf 100 % gesetzt. **: Die Proben unterscheiden sich signifikant ($P < 0,01$, Mann-Whitney U Test).

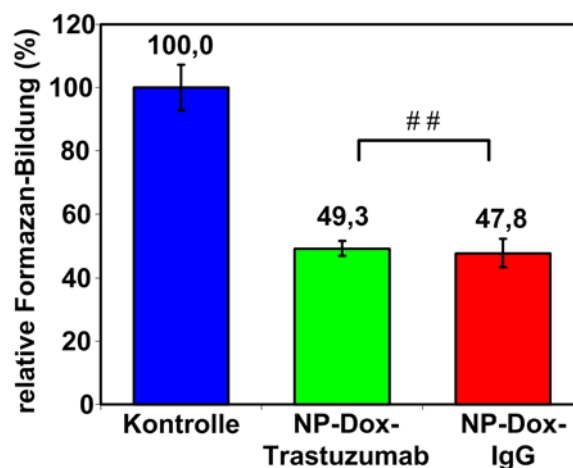


Abb.19 Zellviabilitäts-Assay: Vergleich zwischen NP-Dox-Trastuzumab und NP-Dox-IgG. MCF-7-Zellen wurden mit **NP-Dox-Trastuzumab** oder **NP-Dox-IgG** in gleicher Konzentration für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen für weitere 7 Tage bei 37 °C kultiviert. Die Zellviabilität wurde nach Zugabe des WST-1-Reagenz durch Messung der Formazan-Bildung bestimmt. Unbehandelte Zellen wurden als Standard auf 100 % gesetzt. ##: Die Proben unterscheiden sich nicht signifikant ($P > 0,05$, Mann-Whitney U Test).

Die Ergebnisse des Mammakarzinom-Zellen-Targetings konnten bereits 2008 in „Bioconjugate Chemistry“ publiziert werden:

ANHORN, M. G.*, **WAGNER, S***, KREUTER, J., LANGER, K., VON BRIESEN, H.: „Specific targeting of HER2 overexpressing breast cancer cells with doxorubicin loaded trastuzumab modified human serum albumin nanoparticles“. Bioconjugate Chemistry 2008, 19(12), 2321-31

* **gleichberechtigte Autorenschaft**

4.1.2. Melanom-Zellen-Targeting

4.1.2.1. Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel

Unbeladene und Doxorubicin-beladene DI17E6-modifizierte HSA-Nanopartikel sowie die dazugehörigen IgG-modifizierten Kontroll-Partikel, wurden nach dem in Abb.9 schematisch beschriebenen Verfahren synthetisiert. Dabei ergab die physikochemische Charakterisierung eine durchschnittliche Partikelgröße von $166,5 \pm 17,6$ nm für die unbeladenen unmodifizierten Partikel, $181,4 \pm 16,4$ nm für die DI17E6-modifizierten Partikel und $181,6 \pm 15,6$ nm für die IgG-modifizierten Kontroll-Partikel. Die Doxorubicin-beladenen Partikel waren wegen ihrer Beladung mit Wirkstoff durchschnittlich größer und lagen im Bereich von $379,5 \pm 21,5$ nm bis $406,1 \pm 35,8$ nm. Die Polydispersität dieser Partikel lag zwischen $0,026 \pm 0,013$ und $0,086 \pm 0,025$, was für eine monodisperse Verteilung der Partikelgrößen spricht. Die Partikel zeigten ein Zetapotential zwischen $-33,1 \pm 2,6$ mV und $-43,3 \pm 1,1$ mV. Die Doxorubicin-Beladung der Partikel lag durchschnittlich bei $56,70 \pm 2,9$ µg Wirkstoffbeladung pro mg Nanopartikel. Es wurden $16,10 \pm 1,90$ µg DI17E6 bzw. $16,78 \pm 0,47$ µg IgG pro mg Nanopartikel kovalent an die Oberfläche der unbeladenen Partikel gebunden und $15,84 \pm 4,07$ µg DI17E6 bzw. $17,31 \pm 2,27$ µg IgG pro mg Nanopartikel an die Oberfläche der Doxorubicin-beladenen Partikel (Tab.2 und Tab.3).

Tab.2 Physikochemische Charakterisierung der DI17E6- und IgG-modifizierten unbeladenen HSA-Nanopartikel.

HSA-Nanopartikel		unmodifiziert	kovalente Bindung von DI17E6	kovalente Bindung von IgG
		NP	NP-DI17E6	NP-IgG
Partikeldurchmesser	[nm]	$166,5 \pm 17,6$	$181,4 \pm 16,4$	$181,6 \pm 15,6$
Polydispersität		$0,034 \pm 0,012$	$0,026 \pm 0,013$	$0,063 \pm 0,045$
Zetapotential	[mV]	$-43,3 \pm 1,1$	$-37,4 \pm 2,9$	$-38,4 \pm 0,7$
Partikelgehalt	[mg/ml]	$19,42 \pm 1,62$	$15,92 \pm 0,60$	$16,02 \pm 1,99$
Antikörper Bindungseffizienz	[µg/mg]		$16,10 \pm 1,90$	$16,78 \pm 0,47$

Tab.3 Physikochemische Charakterisierung der DI17E6- und IgG-modifizierten Doxorubicin-beladenen HSA-Nanopartikel.

HSA-Nanopartikel		unmodifiziert	kovalente Bindung von DI17E6	kovalente Bindung von IgG
		NP-Dox	NP-Dox-DI17E6	NP-Dox-IgG
Partikeldurchmesser	[nm]	379,5 ± 21,5	404,9 ± 27,0	406,1 ± 35,8
Polydispersität		0,086 ± 0,025	0,040 ± 0,045	0,036 ± 0,021
Zetapotential	[mV]	-33,1 ± 2,6	-40,3 ± 3,1	-39,1 ± 4,2
Partikelgehalt	[mg/ml]	15,3 ± 1,1	14,4 ± 1,2	14,4 ± 1,1
Antikörper Bindungseffizienz	[µg/mg]		15,84 ± 4,07	17,31 ± 2,27
Wirkstoffbeladung	[µg/mg]	56,7 ± 2,9	56,7 ± 2,9	56,7 ± 2,9

4.1.2.2. Nachweis der Antikörper-Modifikation auf der Partikeloberfläche

Zunächst sollte überprüft werden, ob eine Modifikation der Partikeloberfläche mit dem spezifischen Antikörper DI17E6 stattgefunden hat. DI17E6 ist ein monoklonaler Antikörper mit einer IgG-Grundstruktur, die für eine Reaktion mit einem Gold-markierten anti-human-IgG-Antikörper ausgenutzt werden kann. In Raster-Elektronen-Mikroskopie-Aufnahmen sind die Nanopartikel als graue Kugeln im Größenbereich von 200 nm zu erkennen (Abb.20). Die Bindung der Gold-markierten anti-human-IgG-Antikörper an den DI17E6-Antikörper war im Rückstreu-Elektronen (BSE)-Modus als kleine weiße Kugeln auf der Oberfläche der DI17E6-modifizierten Nanopartikel zu sehen (Abb.20a und b). Dagegen fand mit den unmodifizierten Nanopartikeln keine Reaktion statt (Abb.20c).

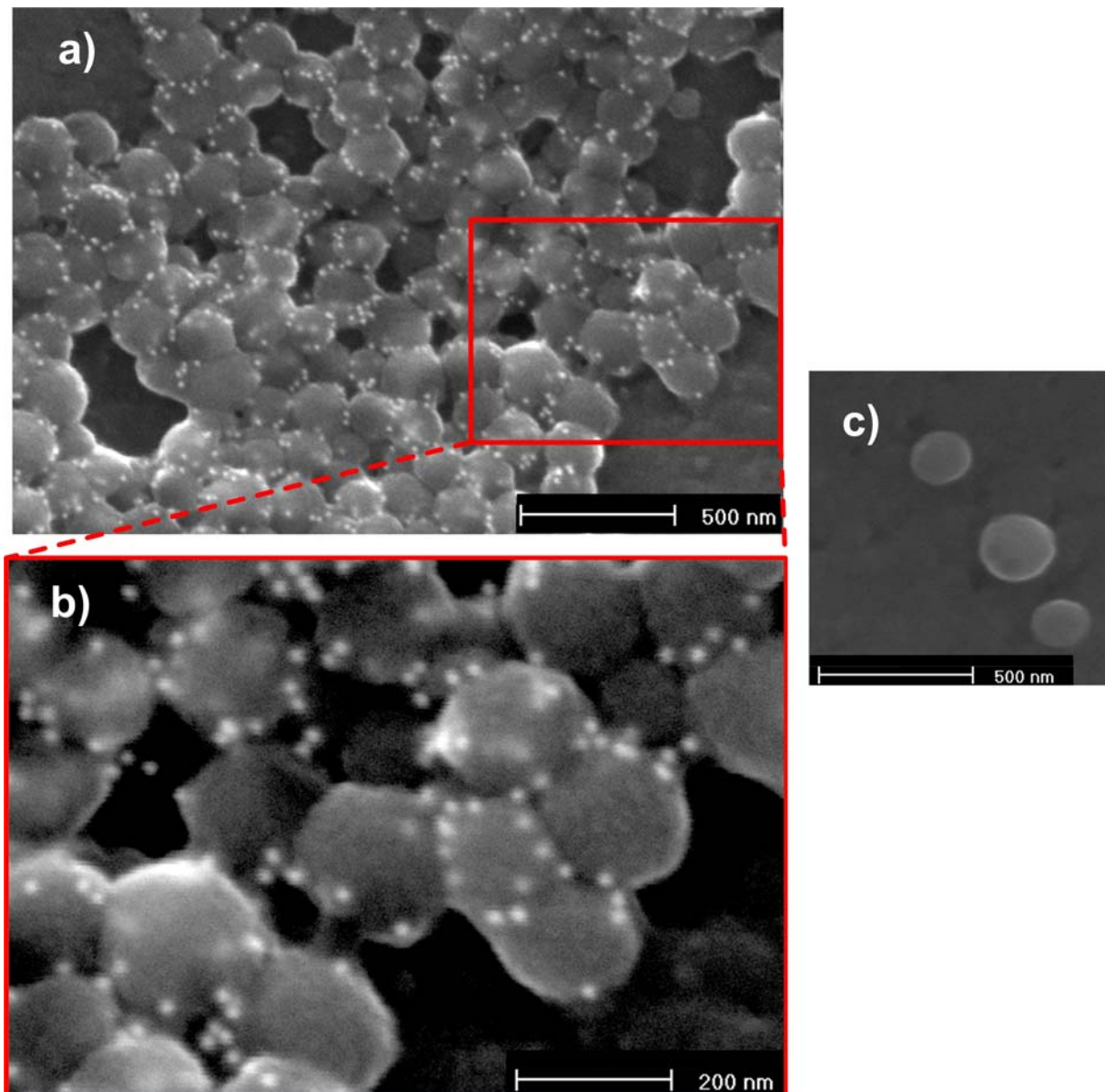


Abb.20 Nachweis der DI17E6-Modifikation auf der Partikeloberfläche mittels Raster-Elektronen-Mikroskopie.

a) Nanopartikel mit DI17E6-Modifikation auf der Partikeloberfläche, **b)** Vergrößerung von a) im roten Viereck und **c) Nanopartikel ohne Antikörper-Modifikation** wurden für 1 h bei 4 °C mit einem 18 nm kolloidalen Gold anti-human-IgG-Antikörper inkubiert. Die markierten Nanopartikel wurden fixiert und dehydriert. Die Aufnahmen wurden mit einem Feldemissions-Raster-Elektronen-Mikroskop FESEM XL30 (Philips, USA) angefertigt.

4.1.2.3. Bindungs-Studie

Auch bei den nanopartikulären Formulierungen zum spezifischen Melanom-Zellen-Targeting musste zunächst die zelluläre Bindung mittels Durchflusszytometrie überprüft werden. $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positive M21-Zellen und α_v -defekte Kontroll-Zellen M21L wurden entweder mit den α_v -spezifischen DI17E6-modifizierten Nanopartikeln (NP-DI17E6) oder mit den unspezifischen IgG-modifizierten Nanopartikeln (NP-IgG) inkubiert. Wie in Abb.21a zu sehen ist, war mit 45,72 % positiver Zellen ein spezifisches Targeting mit den DI17E6-modifizierten Nanopartikeln zu erreichen, dagegen zeigten die IgG-modifizierten Nanopartikel mit 7,30 % positiver Zellen eine geringe zelluläre Bindung an die M21-Zellen. Bei den M21L Kontroll-Zellen zeigten die beiden nanopartikulären Formulierungen, NP-DI17E6 und NP-IgG, eine ähnliche unspezifische Bindung (24,81 – 31,93 % positive Zellen) (Abb.21a).

Die Beladung der Nanopartikel mit dem Zytostatikum Doxorubicin hatte keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften. NP-Dox-DI17E6 zeigten eine gute zelluläre Bindung an die M21-Zellen, NP-Dox-IgG dagegen eine geringe (Abb.21b). Auch bei den Doxorubicin-beladenen Nanopartikeln konnte eine schwache unspezifische zelluläre Bindung sowohl der NP-Dox-DI17E6 als auch der NP-Dox-IgG an die Kontroll-Zellen M21L festgestellt werden (Abb.21b).

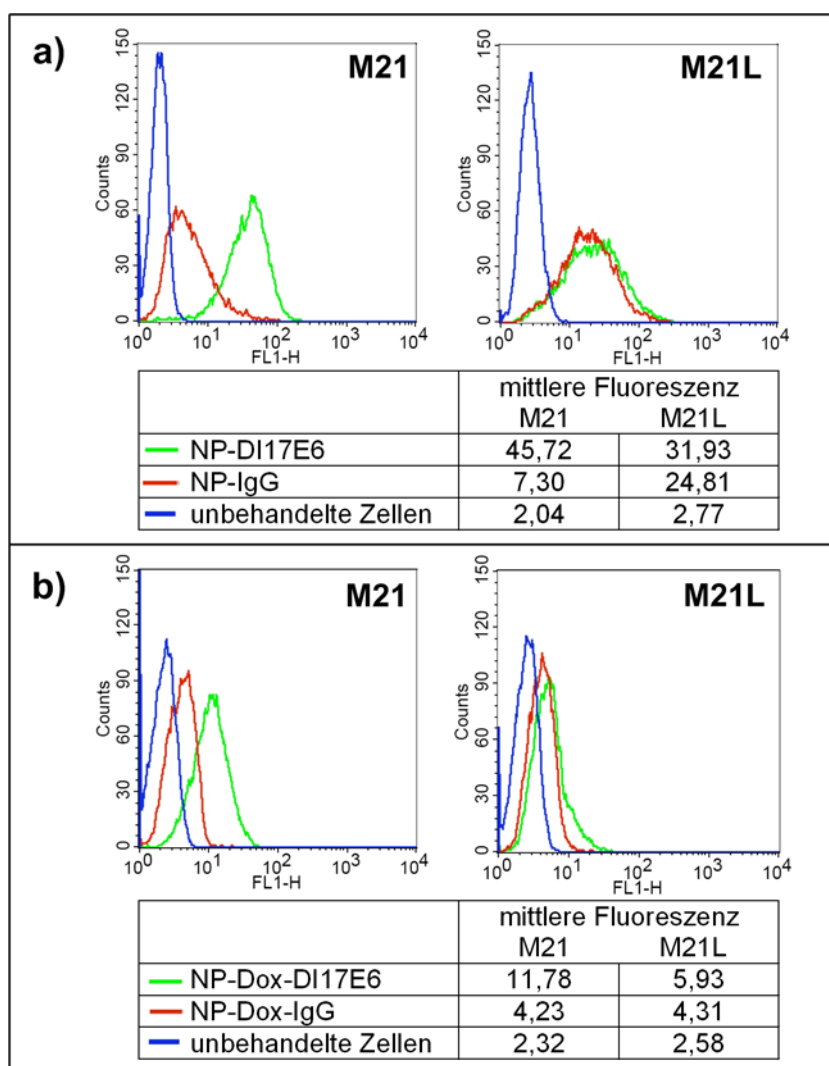


Abb.21 Spezifische zelluläre Bindung unbeladener und Doxorubicin-beladener DI17E6-modifizierter Nanopartikel an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positive Melanom-Zellen M21 und Kontrolle der zellulären Bindung an α_v -defekte Melanom-Zellen M21L.

a) M21-Zellen und M21L-Zellen wurden mit 2 $\mu\text{g/ml}$ der **verschiedenen unbeladenen nanopartikulären Formulierungen** oder **b) den verschiedenen Doxorubicin-beladenen nanopartikulären Formulierungen** für 4 h bei 37 °C inkubiert (Die Konzentrationen sind bezogen auf die DI17E6-Konzentration bzw. äquivalente NP-Mengen). Die zelluläre Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind sowohl als Histogramme des FL1-H-Kanals (Autofluoreszenzbereich der Nanopartikel) gezeigt als auch als Tabelle mit der mittleren Fluoreszenz dargestellt. Grün: NP-DI17E6 bzw. NP-Dox-DI17E6; rot: NP-IgG bzw. NP-Dox-IgG; blau: unbehandelte Zellen.

4.1.2.4. Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung

Konfokale Raster-Lasermikroskopie

Die zelluläre Aufnahme und die subzelluläre Verteilung der Doxorubicin-beladenen nanopartikulären Formulierungen konnte mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie (CLSM) gezeigt werden. M21-Zellen wurden sowohl mit den spezifischen DI17E6-modifizierten Nanopartikeln (NP-Dox-DI17E6) als auch den unspezifischen Kontroll-Partikeln (NP-Dox-IgG) inkubiert. Während die DI17E6-modifizierten Nanopartikel in das Zellinnere aufgenommen wurden (Abb.22b), klebten die unspezifischen IgG-modifizierten Nanopartikel an der äußeren Zellmembran (Abb.22a).

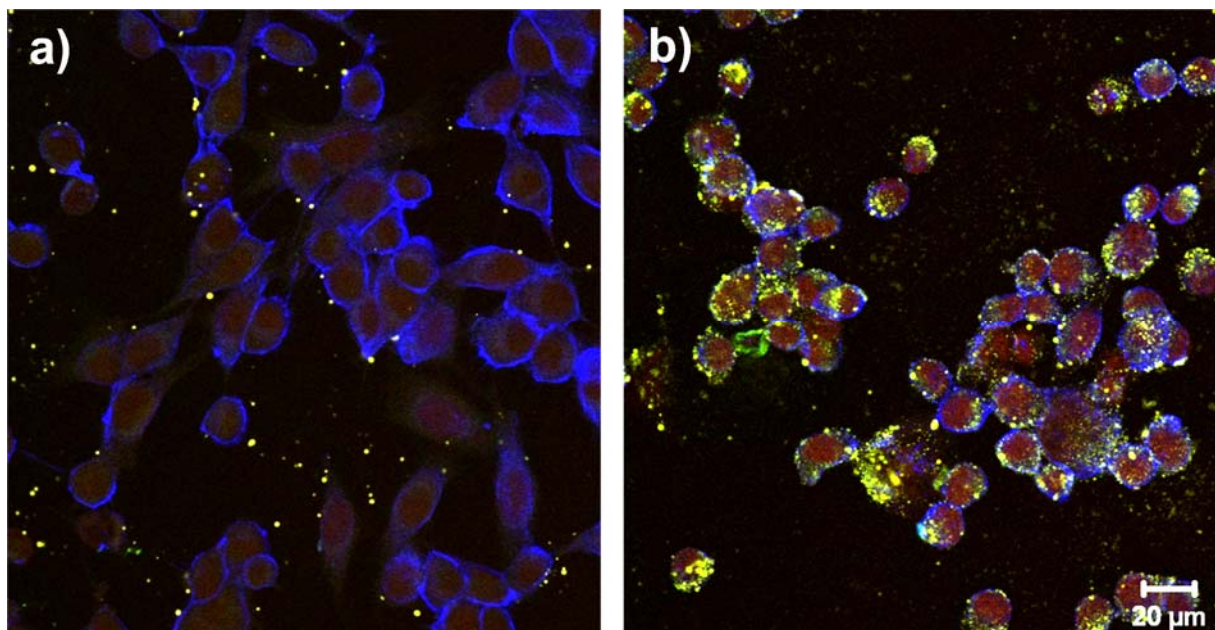


Abb.22 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der Nanopartikel untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie.

M21-Zellen wurden mit 2 µg/ml der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen (bezogen auf die DI17E6-Konzentration bzw. äquivalente NP-Menge) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die grüne Autofluoreszenz der Nanopartikel und die rote Autofluoreszenz des Doxorubicins wurden für die Detektion genutzt. Die Zellmembran wurde mit Concanavalin A Alexa Fluor 350 blau gefärbt. Die Bilder wurden in einer Schnittebene im Inneren der Zelle aufgenommen. **a)** Inkubation der Zellen mit den **unspezifischen NP-Dox-IgG**. **b)** Inkubation der Zellen mit den **spezifischen NP-Dox-DI17E6**.

Eine andere Vergrößerung der CLSM-Aufnahmen von Zellen, die mit NP-Dox-DI17E6 inkubiert waren und die Auflösung des Bildes in die einzelnen Fluoreszenzkanäle verdeutlichten die intrazelluläre Aufnahme der Nanopartikel (Abb.23). Besonders die optische Schnittfolge in Abb.24 verifiziert dieses Ergebnis.

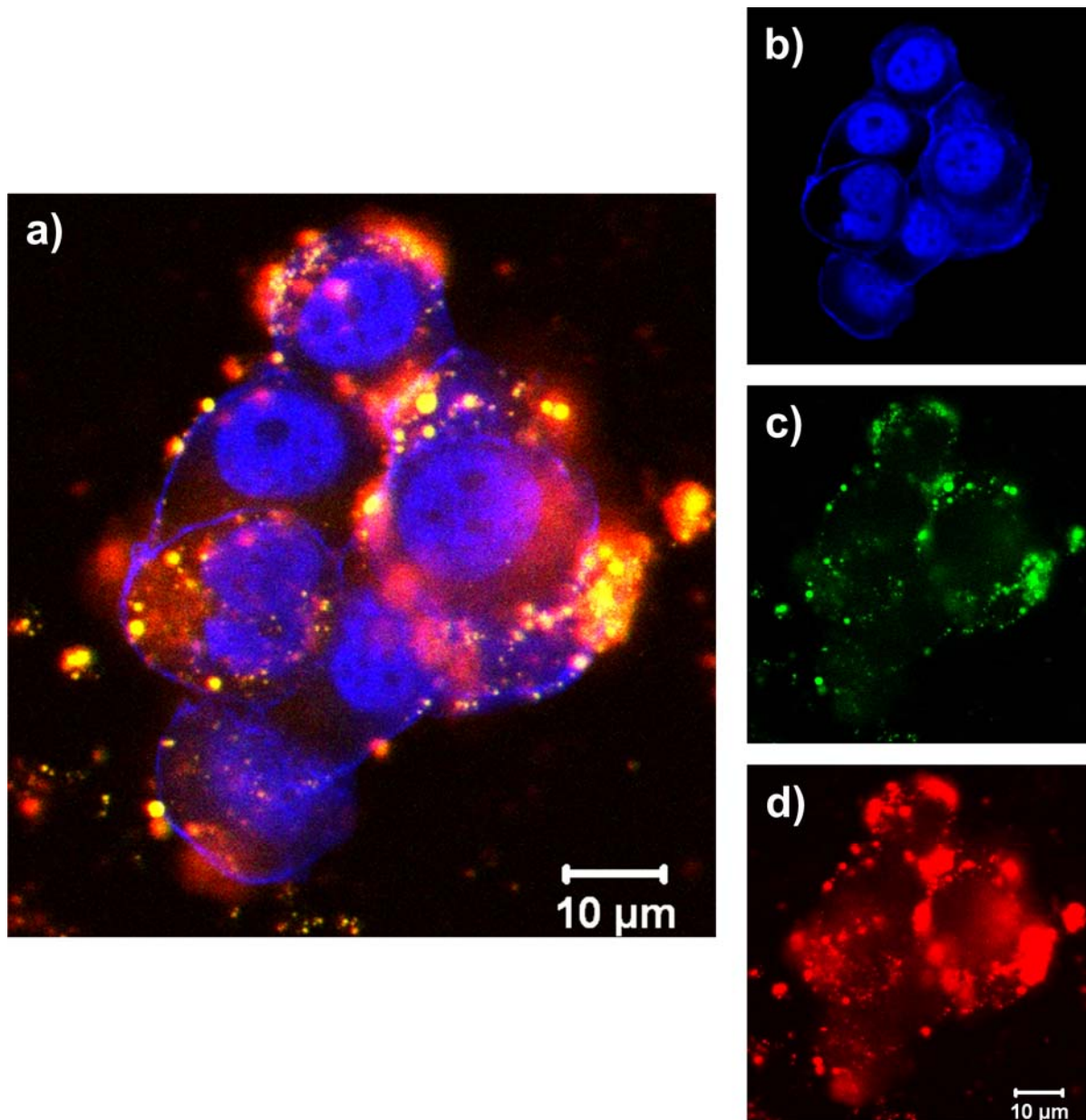


Abb.23 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von NP-Dox-DI17E6 untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie: Aufspaltung der Fluoreszenzkanäle.

M21-Zellen wurden mit 10 µg/ml **NP-Dox-DI17E6** für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die grüne Autofluoreszenz der Nanopartikel und die rote Autofluoreszenz des Doxorubicins wurden für die Detektion genutzt. Die Zellmembran wurde mit Concanavalin A Alexa Fluor 350 blau und der Zellkern mit DAPI blau gefärbt. Die Bilder wurden in einer Schnittebene im Inneren der Zelle aufgenommen. **a) Überlagerung aller Fluoreszenzkanäle.** **b) Blauer Fluoreszenzkanal der Zellmembran- und Kernfärbung.** **c) Grüner Fluoreszenzkanal der Nanopartikel-Autofluoreszenz.** **d) Roter Fluoreszenzkanal der Doxorubicin-Autofluoreszenz.**

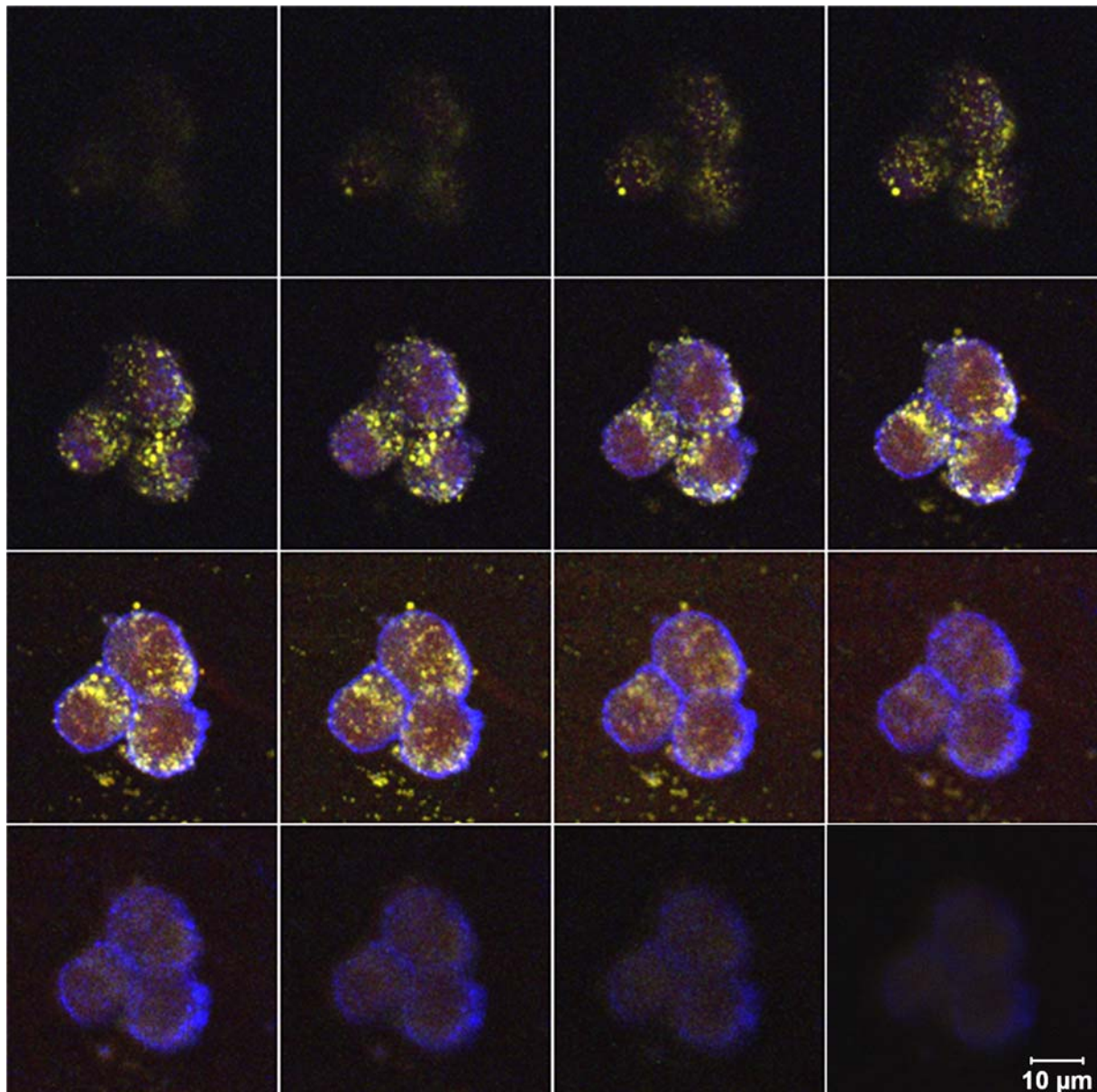


Abb.24 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von NP-Dox-DI17E6 untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie: Schnittfolge.

M21-Zellen wurden mit 2 µg/ml **NP-Dox-DI17E6** für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die grüne Autofluoreszenz der Nanopartikel und die rote Autofluoreszenz des Doxorubicins wurden für die Detektion genutzt. Die Zellmembran wurde mit Concanavalin A Alexa Fluor 350 blau gefärbt. Gezeigt ist eine Schnittfolge durch die Zellen in 1 µm Abstand.

Auch für weitergehende Untersuchungen zur zellulären Aufnahme und intrazellulären Verteilung der Nanopartikel konnte die konfokale Raster-Lasermikroskopie genutzt werden. Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm wurden die unbehandelten Zellen kaum zur Fluoreszenz angeregt, jedoch intrazellulär aufgenommene Nanopartikel und Doxorubicin. Nach einer Zwei-Photonen-Anregung bei 750 nm waren sowohl die unbehandelten Zellen als auch die mit Nanopartikeln oder freiem Doxorubicin inkubierten Zellen zu detektieren. Bei Letzteren war eine deutliche

Verstärkung des Fluoreszenzsignals gegenüber den unbehandelten Zellen zu erkennen. Mit einer Zwei-Photonen-Anregung bei 960 nm konnte man nur noch die mit Nanopartikeln oder freiem Doxorubicin behandelten Zellen zur Fluoreszenz anregen (Abb.25).

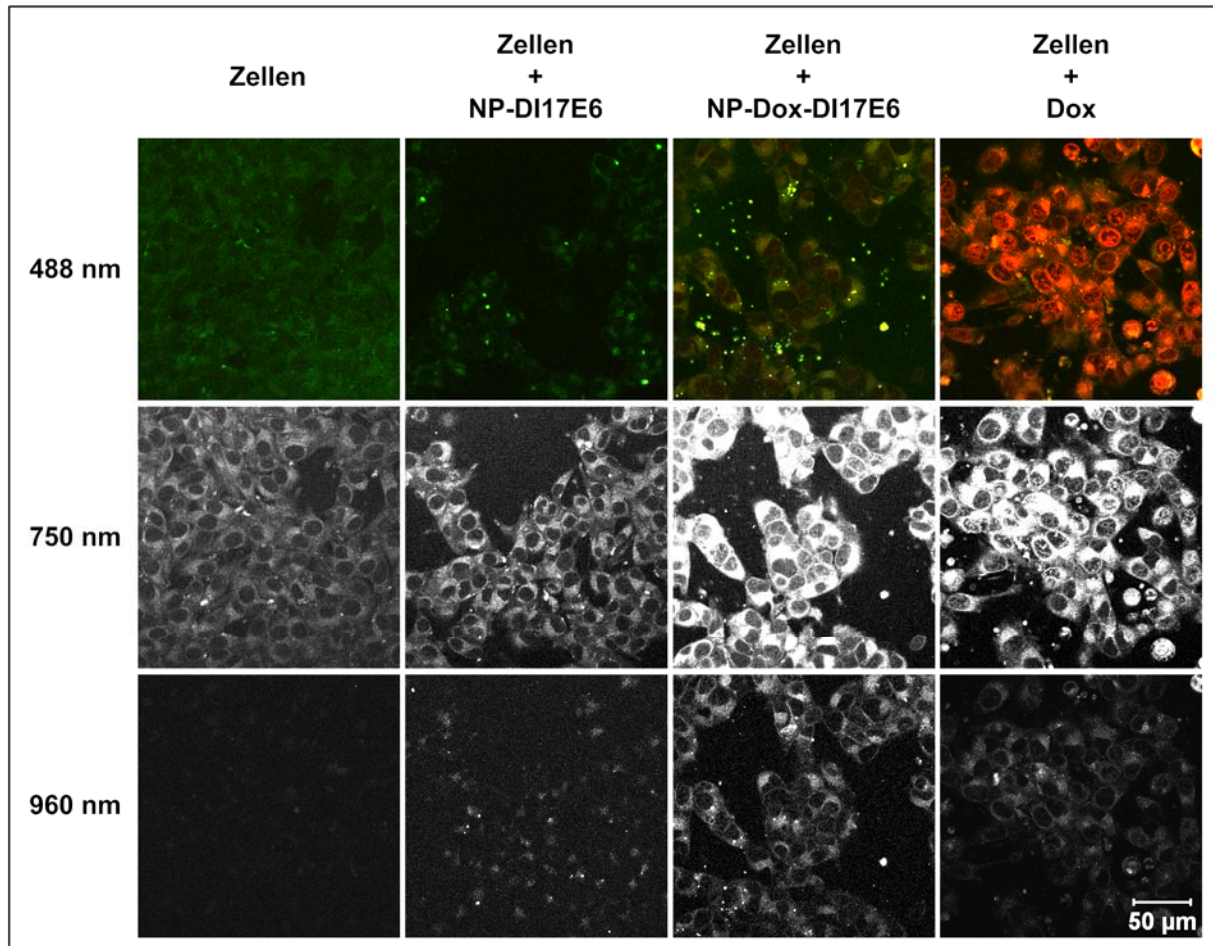


Abb.25 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen und von freiem Doxorubicin untersucht mittels konfokaler Raster-Laser-mikroskopie bei verschiedenen Wellenlängen.

M21-Zellen wurden mit **NP-DI17E6**, **NP-Dox-DI17E6** und **freiem Doxorubicin** für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 488 nm, 750 nm und 960 nm lebend vermessen.

Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse (FLIM)

Bei der Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse wurde versucht, die einzelnen fluoreszierenden Komponenten anhand ihrer unterschiedlichen mittleren Lebenszeiten zu unterscheiden (Abb.26a). In Abb.26b - d ist die Lebenszeit τ_2 als Falschfarben-Darstellung für die mit Doxorubicin oder mit den beladenen oder unbeladenen Nanopartikeln inkubierten Zellen gezeigt.

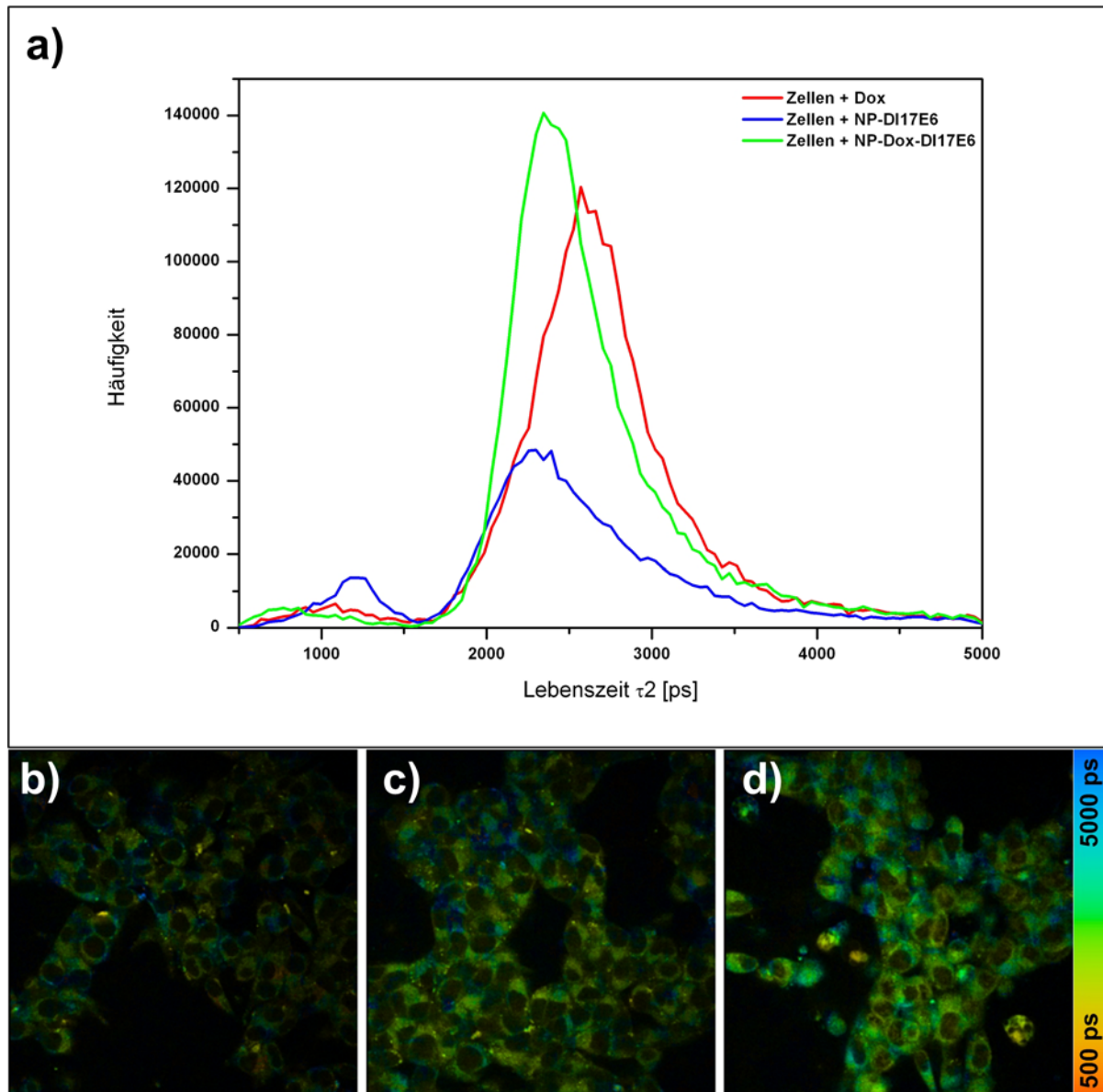


Abb.26 Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse.

M21-Zellen wurden mit **NP-DI17E6**, **NP-Dox-DI17E6** und **freiem Doxorubicin** für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 750 nm lebend vermessen. a) Verteilung der Lebenszeit τ_2 . b - d) Falschfarben-Darstellung der Lebenszeit τ_2 für b) Zellen mit NP-DI17E6, c) Zellen mit NP-Dox-DI17E6 und d) Zellen mit freiem Doxorubicin.

4.1.2.5. Biologische Wirksamkeitstestung

Bei diesen DI17E6-modifizierten Doxorubicin-beladenen nanopartikulären Formulierungen zum spezifischen Melanom-Targeting haben nicht nur die Partikel über den in die Partikelmatrix inkorporierten Wirkstoff Doxorubicin eine spezifische biologische Wirksamkeit, sondern auch der an die Partikeloberfläche gebundene Antikörper DI17E6 hat ebenfalls eine gesonderte biologische Wirksamkeit. Diese von dem Antikörper ausgehende biologische Wirksamkeit wurde im Zell-Attachment- bzw. Zell-Deachment-Assay überprüft. Über die Bestimmung der Zellviabilität nach Partikel-Inkubation konnte die spezifische biologische Wirksamkeit des gesamten Partikel-Systems gezeigt werden.

Zell-Attachment-Assay und Zell-Detachment-Assay

Die zelluläre Anhaftung an Vitronektin (VN)-beschichteten Oberflächen erfolgt hauptsächlich über die $\alpha_v\beta_3$ -Integrine, den so genannten Vitronektin-Rezeptoren. Daher führt eine Inhibierung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrine zu einer Ablösung („Detachment“) von bereits angehafteten Zellen oder verhindert die Anhaftung („Attachment“) der Zellen an VN-beschichteten Oberflächen.

Der monoklonale Antikörper DI17E6 konnte diese $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Stellen auf den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiven Melanom-Zellen M21 blockieren und somit das Anhaften („Attachment“) der Zellen auf VN-beschichteten Oberflächen verhindern (Abb.27). Die mit DI17E6 modifizierte nanopartikuläre Formulierung inhibierte ebenso hoch signifikant das „Attachment“ der Zellen, dagegen konnten die Kontroll-Formulierung die Zellen dahin gehend weniger beeinflussen (Abb.27).

Für das Ablösen („Detachment“) bereits angehafter Zellen waren höhere DI17E6-Konzentrationen notwendig als für die Hemmung der Zellanhaftung (4 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ im Vergleich zu 2 $\mu\text{g/ml}$). Jedoch war ein Ablösen der M21-Zellen von VN-beschichteten Oberflächen mit den DI17E6-modifizierten Nanopartikeln (NP-DI17E6) ebenso wie mit freiem DI17E6-Antikörper möglich (Abb.28). Auch die Doxorubicin-beladenen DI17E6-modifizierten Nanopartikel (NP-Dox-DI17E6) zeigten eine hoch signifikante „Detachment“-Effizienz (Abb.28). Die Beladung der Partikel mit dem Wirkstoff Doxorubicin hatte darauf keinen Einfluss.

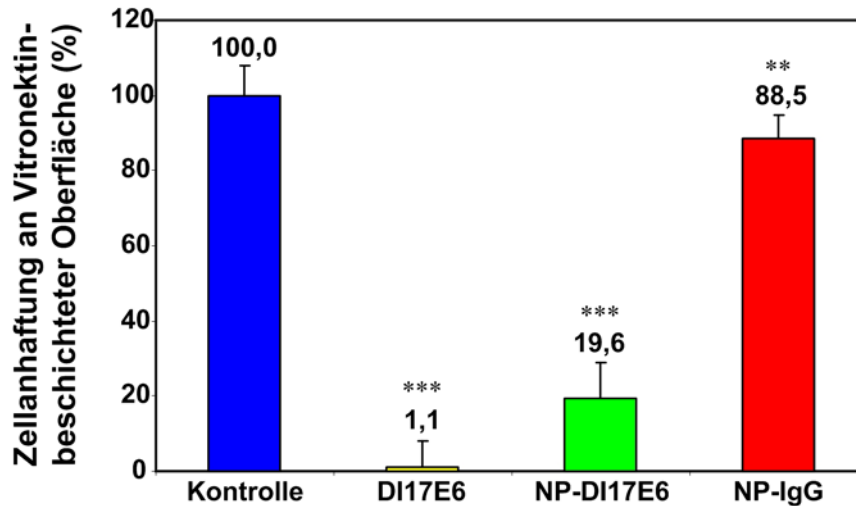


Abb.27 Zell-Attachment-Assay: Verhinderung der Zellanhaftung an Vitronectin-beschichteten Oberflächen.

2 µg/ml freier DI17E6-Antikörper oder die **verschiedenen nanopartikulären Formulierungen** (Konzentration bezogen auf die DI17E6-Konzentration bzw. äquivalente NP-Menge) wurden zusammen mit den M21-Zellen auf VN-beschichteten ELISA-Platten inkubiert. Nach 1 h Inkubationszeit wurden die nicht angehafteten Zellen entfernt und die angehafteten Zellen wurden mit CyQUANT GR gefärbt. Die Proben unterscheiden sich ***: hoch signifikant ($P < 0,001$, Mann-Whitney U Test) bzw. **: signifikant ($P < 0,01$, Mann-Whitney U Test) von der Kontrolle.

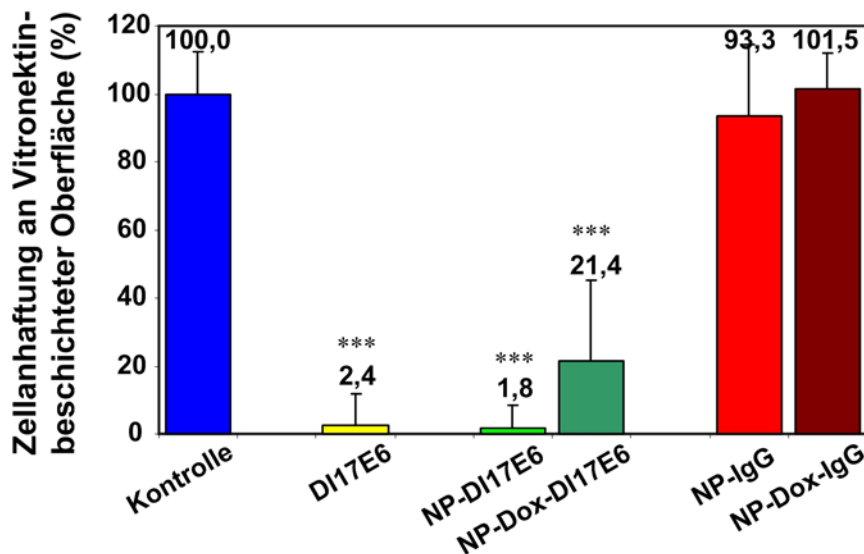


Abb.28 Zell-Detachment-Assay: Ablösen der Zellen von Vitronectin-beschichteten Oberflächen.

Für den Zell-Detachment-Assay wurden 96-Loch ELISA-Platten mit Vitronectin beschichtet. M21-Zellen konnten für 1 h an diese Oberfläche anhaften. Danach wurde mit 10 µg/ml freiem DI17E6-Antikörper oder den **verschiedenen nanopartikulären Formulierungen** (Konzentration bezogen auf die DI17E6-Konzentration bzw. äquivalente NP-Menge) für 4 h bei 37 °C inkubiert, um ein Ablösen der Zellen zu induzieren. Abgelöste Zellen wurden entfernt und die verbliebenen angehafteten Zellen wurden mit CyQUANT GR gefärbt. Die Proben unterscheiden sich ***: hoch signifikant ($P < 0,001$, Mann-Whitney U Test) von der Kontrolle.

Kinetik der Zell-Ablösung

Eine Kinetik des induzierten Ablösens der Zellen durch die verschiedenen nanopartikulären Formulierungen oder freies Doxorubicin bestätigte die Ergebnisse des Zell-Detachment-Assays. Die Kinetik wurde mittels Durchlicht-Zeitraffer-Mikroskopie über 1 - 2 Tage verfolgt, dabei wurden in 7-minütigem Abstand Bilder aufgenommen. Die Zeit bis zum Ablösen der Zellen wurde bestimmt und sie betrug nach Inkubation mit unbeladenen DI17E6-modifizierten Nanopartikeln 2 - 22 h (Tab.3). Dagegen lösten die Doxorubicin-beladenen DI17E6-modifizierten Nanopartikel ein vollständiges Detachment der Zellen schon innerhalb der ersten 3 h aus (Tab.3). Die IgG-modifizierten Kontroll-Partikel zeigten keinen Einfluss auf das Anhaften bzw. Ablösen der Zellen. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Doxorubicin-beladenen DI17E6-modifizierten Nanopartikel innerhalb von 10 h schneller den Zelltod auslösten als das freie Zytostatikum Doxorubicin, das dies erst nach 17 h bewirkte (Tab.4). Wegen der geringen unspezifischen zellulären Bindung der IgG-modifizierten Doxorubicin-beladenen Nanopartikel, was sowohl in den Durchflusszytometrie-Experimenten (Abb.21) als auch in den CLSM-Daten (Abb.22) zu erkennen war, lösten auch die NP-Dox-IgG nach 20 h den Zelltod aus (Tab.4).

Tab.4 Tabellarische Auswertung einer Langzeit-Inkubation der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen.

	Ablösen der Zellen [h nach Inkubation*]	Zelltod [h nach Inkubation*]
NP-Dox-DI17E6	0,25 - 3	10
NP-DI17E6	2 - 22	> 48**
Doxorubicin	> 48**	17
NP-Dox-IgG	> 48**	20
unbehandelte Zellen	> 48**	> 48**

*: gesamte Inkubationszeit: 1 - 2 Tage, **: keine Wirkung innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Zellviabilitäts-Assay

Die biologische Aktivität der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen wurde anhand eines MTT-Zellviabilitäts-Assays getestet. Tab.5 zeigt anhand von IC₅₀-Werten die Konzentrationen, die nötig sind, um eine halbmaximale Inhibition der Zellviabilität zu erreichen. Diese Werte sind daher ein Maß für die Effektivität von Doxorubicin, sowohl in seiner freien Form als auch nanopartikulär gebunden, die Zellviabilität zu reduzieren. Im Fall der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiven Melanom-Zellen M21 war nanopartikulär gebundenes Doxorubicin, sowohl in den unmodifizierten Nano-

partikeln als auch in den DI17E6-modifizierten Nanopartikeln effektiver als freies Doxorubicin (Tab.5). Die unspezifischen IgG-modifizierten Doxorubicin-beladenen Kontroll-Partikel zeigten keinen nennenswerten Einfluss auf die Zellviabilität. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der α_v -defekten Kontroll-Zellen M21L, so konnte bei diesen keine biologische Aktivität der DI17E6-modifizierten Partikel festgestellt werden. Nur die unmodifizierten Doxorubicin-beladenen Nanopartikel und freies Doxorubicin induzierten einen Effekt.

Der freie Antikörper war in den eingesetzten Konzentrationen nicht zytotoxisch.

Tab.5 IC₅₀-Werte der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen.

	IC ₅₀ $\alpha_v\beta_3$ -positive Zellen (M21) [ng/ml]	IC ₅₀ Kontroll-Zellen (M21L) [ng/ml]
NP-Dox-DI17E6	8,0 ± 0,2	> 100
NP-Dox-IgG	> 100	> 100
NP-Dox unmodifiziert	30,8 ± 3,5	75,4 ± 8,3
Doxorubicin	57,5 ± 3,7	70,7 ± 0,8
DI17E6	> 100	> 100

Teilergebnisse des Melanom-Zellen-Targetings sind in „Biomaterials“ publiziert:

WAGNER, S., ROTHWEILER, F., ANHORN, M. G., SAUER, D., RIEMANN, I., WEISS, E. C., KATSEN-GLOBA, A., MICHAELIS, M., SCHWARTZ, D., KREUTER, J., VON BRIESEN, H., LANGER, K.: „Enhanced Drug Targeting by Attachment of an Anti α_v -Integrin Antibody on Doxorubicin Loaded Human Serum Albumin Nanoparticles“. Biomaterials, 2010, 31, 2388-2398

4.2. Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Sowohl die unbeladenen als auch die Wirkstoff-beladenen Nanopartikel auf der Grundlage von humanem Serumalbumin (HSA) zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) wurden, bis auf geringe Modifikationen, nach einem etablierten Desolvationsverfahren hergestellt [45, 46]. Die Synthese erfolgte ähnlich wie in Abb.9 dargestellt, wobei in diesem Fall nicht Doxorubicin als Wirkstoff eingesetzt wurde, sondern Obidoxim. Der instabile Kolloid wurde ebenfalls mit Glutaraldehyd quervernetzt und damit stabilisiert. Für die spezifische Modifikation der HSA-Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke wurden keine monoklonalen Antikörper als Liganden eingesetzt, sondern das Apolipoprotein E (ApoE). Dieses wurde ebenfalls, nach Thiolierung, kovalent an die Oberfläche der Nanopartikel mittels des bifunktionalen NHS-PEG-Mal-Crosslinkers gebunden.

4.2.1. Apolipoprotein-modifizierte unbeladene Nanopartikel: Aufklärung des Transportmechanismus über die Blut-Hirn-Schranke

4.2.1.1. Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel

HSA-basierende ApoE-modifizierte Nanopartikel sowie dazugehörige PEGylierte Kontroll-Partikel wurden nach einem etablierten Desolvationsverfahren synthetisiert. Die physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel ergab für die ApoE-modifizierten Nanopartikel eine mittlere Größe von durchschnittlich $220,1 \pm 30,0$ nm und von $202,1 \pm 21,3$ nm für die dazugehörigen PEGylierten Kontroll-Nanopartikel. Das Zetapotential der Nanopartikel lag zwischen $-32,0 \pm 9,5$ und $-37,2 \pm 7,6$. Der Polydispersitätsindex war immer kleiner als 0,1. Es lag dementsprechend eine gleichmäßige monodisperse Verteilung der Partikelgrößen vor (Tab.6).

Tab.6 Physikochemische Charakterisierung der ApoE-modifizierten und der PEGylierten HSA-Nanopartikel.

HSA-Nanopartikel		kovalente Bindung von ApoE	PEGyliert
		NP-ApoE	NP-PEG
Partikeldurchmesser	[nm]	$220,1 \pm 30,0$	$202,1 \pm 21,3$
Polydispersität		$0,063 \pm 0,040$	$0,034 \pm 0,021$
Zetapotential	[mV]	$-37,2 \pm 7,6$	$-32,0 \pm 9,5$
Partikelgehalt	[mg/ml]	$10,9 \pm 4,1$	$12,4 \pm 4,1$

4.2.1.2. Bindungs-Studie

Auch für die nanopartikulären Formulierungen zum Targeting der Blut-Hirn-Schranke musste zunächst die spezifische zelluläre Bindung an entsprechenden Target-Zellen mittels Durchflusszytometrie überprüft werden. Dafür wurden die Maus-Gehirnendothelioma-Zellen bEnd3 entweder mit den spezifischen ApoE-modifizierten Nanopartikeln (NP-ApoE) oder mit den unspezifischen PEGylierten Kontroll-Nanopartikeln (NP-PEG) sowohl bei 37 °C als auch bei 4 °C inkubiert. Die Histogramme der beiden Inkubationstemperaturen sind in Abb.29 vergleichend nebeneinander dargestellt. Bei 37 °C ist eine spezifische zelluläre Bindung der ApoE-modifizierten Nanopartikel anhand 36,73 % positiver Zellen zu erkennen. Im Vergleich dazu ist die zelluläre Bindung mit 3,14 % positiver Zellen nach Inkubation mit den Kontroll-Nanopartikeln sehr gering und als unspezifisch einzustufen. Bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C findet dagegen sowohl für die unspezifischen als auch für die spezifischen Nanopartikel fast keine zelluläre Bindung mehr statt (jeweils unter 2 % positive Zellen).

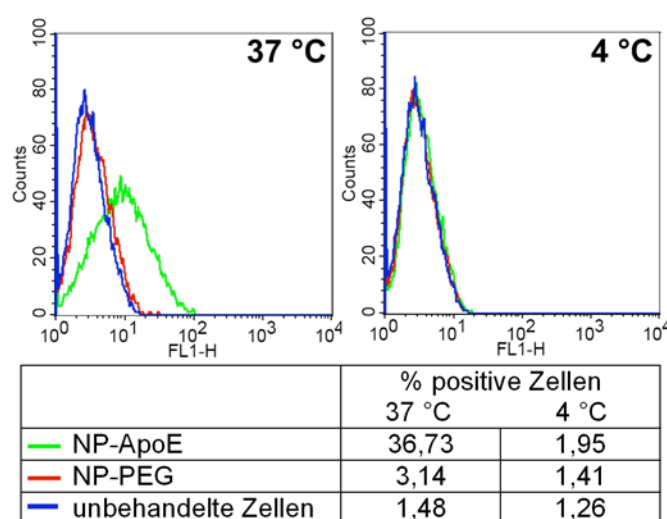


Abb.29 Spezifische zelluläre Bindung ApoE-modifizierter Nanopartikel.

bEnd3-Zellen wurden mit **NP-ApoE** oder **NP-PEG** für 4 h bei 37 °C bzw. 4 °C inkubiert. Die zelluläre Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind sowohl als Histogramme des FL1-H-Kanals (Autofluoreszenzbereich der Nanopartikel) gezeigt als auch als Tabelle mit der Prozentzahl positiver Zellen dargestellt. Grün: NP-ApoE; rot: NP-PEG; blau: unbehandelte Zellen.

4.2.1.3. Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung

Konfokale Raster-Lasermikroskopie

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme und subzellulären Verteilung der nanopartikulären Formulierungen wurde die konfokale Raster-Lasermikroskopie (CLSM) eingesetzt. bEnd3-Zellen wurden sowohl mit den unspezifischen PEGylierten als auch mit den spezifischen ApoE-modifizierten Nanopartikeln für 4 h bei 37 °C inkubiert. Im Gegensatz zu den unspezifischen PEGylierten Kontroll-Nanopartikeln war eine deutliche intrazelluläre Anreicherung der spezifischen ApoE-modifizierten Nanopartikel zu erkennen (Abb.30).

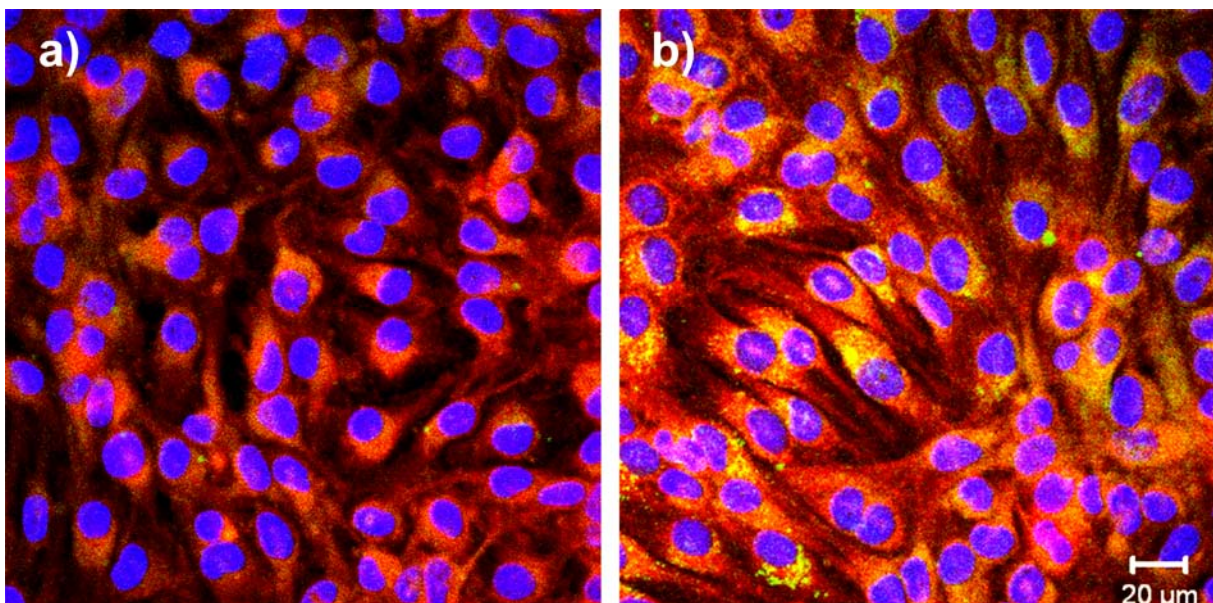


Abb.30 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der unbeladenen Nanopartikel untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie.

bEnd3-Zellen wurden mit 0,1 mg/ml der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die grüne Autofluoreszenz der Nanopartikel wurde für die Detektion genutzt. Das Zytosol wurde mit CellTracker™ Red CMTMPX rot und der Zellkern mit DAPI blau gefärbt. Die Bilder wurden in einer Schnittebene im Inneren der Zelle aufgenommen. **a)** Inkubation der Zellen mit den **unspezifischen NP-PEG**. **b)** Inkubation der Zellen mit den **spezifischen NP-ApoE**.

Eine optische Schnittfolge von 1 μm Schnittdicke durch mit NP-ApoE inkubierte Zellen verdeutlichten die Ergebnisse der spezifischen zellulären Aufnahme (Abb.31).

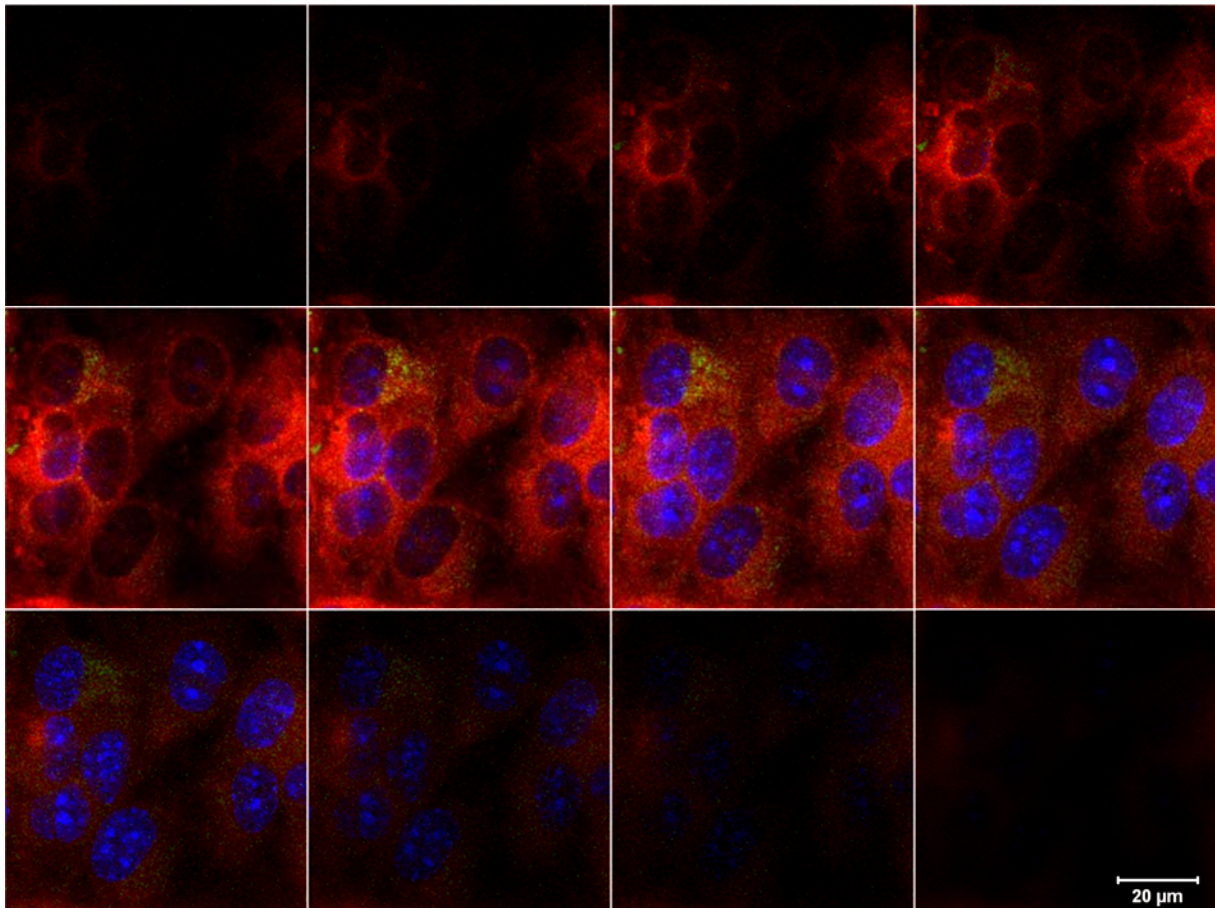


Abb.31 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von NP-ApoE untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie: Schnittfolge.

bEnd3-Zellen wurden mit **NP-ApoE** für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die grüne Autofluoreszenz der Nanopartikel wurde für die Detektion genutzt. Das Zytosol wurde mit CellTracker™ Red CMTPX rot und der Zellkern mit DAPI blau gefärbt. Gezeigt ist eine Schnittfolge durch die Zellen in 1 μm Abstand.

Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Auch die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) konnte zur Klärung der zellulären Aufnahme und intrazellulären Verteilung der ApoE-modifizierten Nanopartikel genutzt werden. Auf TEM-Aufnahmen unbehandelter bEnd3-Zellen waren Mitochondrien, rauhes endoplasmatisches Retikulum, der Zellkern mit Nukleoli und Vesikel zu sehen, aber keine elektronendichte runde Strukturen im Größenbereich der Nanopartikel von 200 – 250 nm (Abb.32a). Nach 2 h Inkubation der Zellen mit den spezifischen ApoE-modifizierten Nanopartikel waren viele dunkle Kugeln mit Partikel-Struktur innerhalb der Zelle zu erkennen (Abb.32b). Diese Partikel wurden eindeutig von den Zellen umhüllt (Abb.32c), eingeschlossen und über Endozytose aufgenommen (Abb.32d).

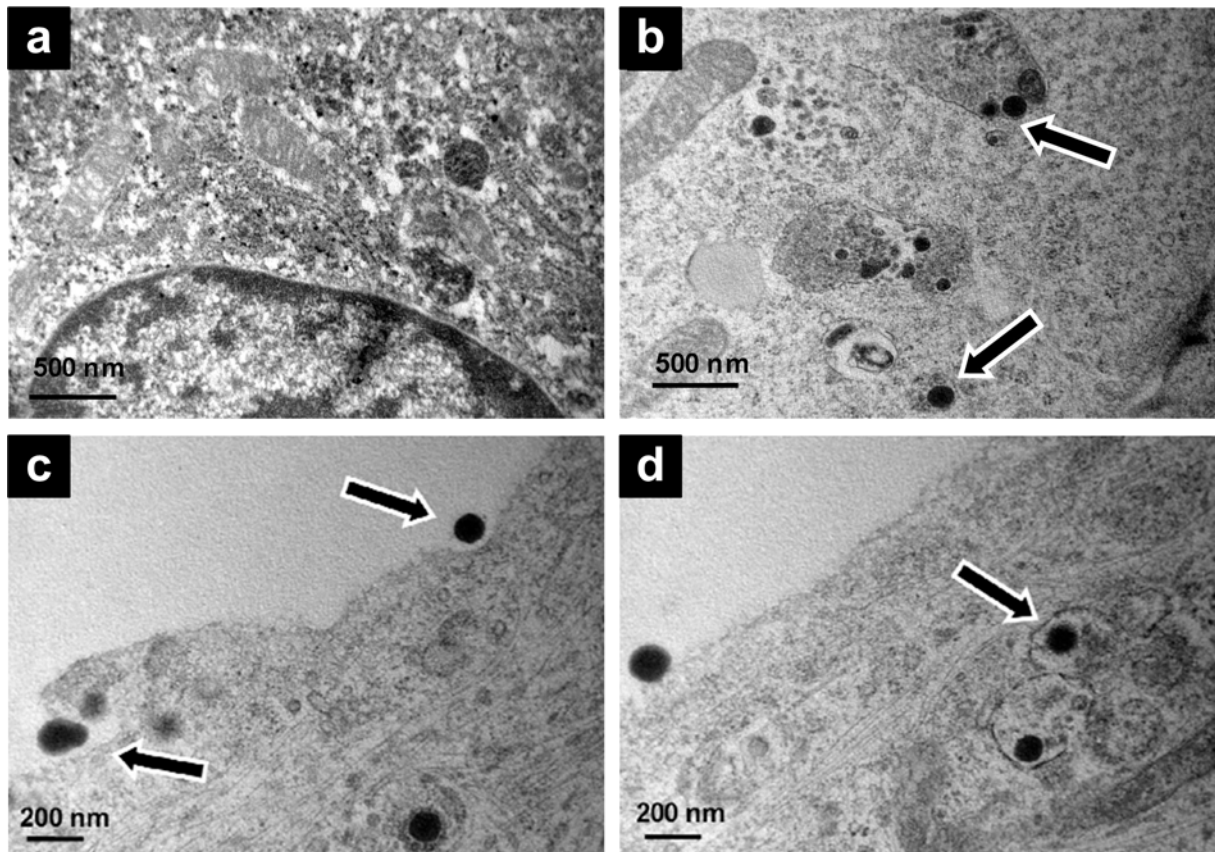


Abb.32 Untersuchungen zur zellulären Aufnahme ApoE-modifizierter Nanopartikel in Maus-Gehirndothelioma-Zellen bEnd3 mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie.

a) Unbehandelte Maus-Gehirndothelioma-Zellen bEnd3: Es waren keine elektronendichte Strukturen im Bereich von 200 - 250 nm zu erkennen. **b)** Nach 2 h Inkubation mit 1 mg/ml **NP-ApoE** bei 37 °C waren dunkle Partikel innerhalb der bEnd3-Zellen zu erkennen. **c)** bEnd3-Zellen formten **Pits** um die Partikel zu endozytieren. **d)** Nach der **Endozytose** waren die Nanopartikel in **Vesikeln** zu finden. Einige Nanopartikel sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.2.1.4. Zellviabilitäts-Assay

Um einen zytotoxischen Effekt dieser Partikel auszuschließen, wurde die Zellviabilität nach der Inkubation der Zellen mit den Nanopartikeln mittels des WST-1-Assays bestimmt. Hierzu wurden bEnd3-Zellen mit den ApoE-modifizierten Nanopartikeln oder den PEGylierten Kontroll-Partikeln in verschiedenen Konzentrationen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellviabilität wurde über Absorptionsmessungen der Formazan-Bildung bestimmt. Die Formazan-Bildung findet nur in den Mitochondrien intakter Zellen statt. Daher waren bei diesen Versuchen unbehandelte Zellen der Standard und wurden auf 100 % gesetzt. Die relative Formazan-Bildung lag nach Inkubation mit allen getesteten Formulierungen zum Teil deutlich über der Kontrolle, wobei keine Unterschiede zwischen den spezifischen ApoE-modifizierten und den PEGylierten Kontroll-Partikel festzustellen waren (Abb.33).

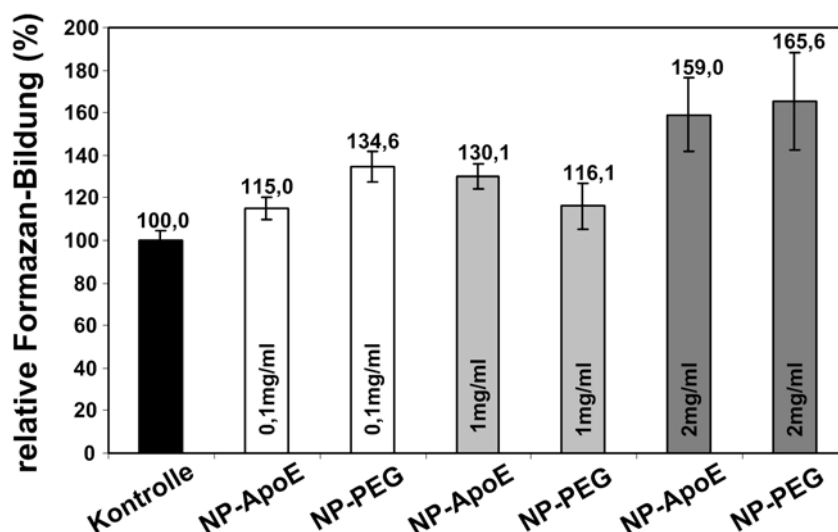


Abb.33 Zellviabilitäts-Assay: Vergleich zwischen NP-ApoE und NP-PEG in verschiedenen Konzentrationen.

bEnd3-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an **NP-ApoE** oder **NP-PEG** für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellviabilität wurde nach Zugabe des WST-1-Reagenz durch Messung der Formazan-Bildung bestimmt. Unbehandelte Zellen wurden als Standard auf 100 % gesetzt.

4.2.1.5. Aufnahmemechanismus-Studien

Untersuchungen zum Rezeptorstatus

Es wird angenommen, dass es sich bei der spezifischen Aufnahme der ApoE-modifizierten Nanopartikel um einen Rezeptor-vermittelten Vorgang handelt. Daher wurden bei der Aufklärung des Aufnahmemechanismus die Zellen zunächst auf bestimmte BHS-typische Rezeptoren untersucht.

Zur Überprüfung des Rezeptor-Status wurden die bEnd3-Zellen mit Antikörpern gegen das „Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein“ (LRP), den „Low Density Lipoprotein Receptor“ (LDLR), den ApoE-Rezeptor (ApoER) und Megalin in verschiedenen Verdünnungen inkubiert. Wie in Tab.7 zusammengefasst, wurden all diese Rezeptoren von den Zellen exprimiert. Megalin, LRP und LDLR waren mit annähernd 100 % positiver Zellen deutlich stärker auf den Zellen vorhanden als ApoER mit 21,08 % positiver Zellen.

Tab.7 Überprüfung des Rezeptorstatus der bEnd3-Zellen.

Rezeptor	% positive Zellen	Rezeptor	% positive Zellen	Rezeptor	% positive Zellen	Rezeptor	% positive Zellen
Megalin		ApoER		LRP		LDLR	
K	1,55	K	1,55	K	1,52	K	1,52
1:100	81,72	1:100	3,17	1:1000	95,26	1:70	97,88
1:50	96,21	1:20	9,94	1:500	98,03		
1:10	99,28	1:10	21,08				

Koinkubationsexperimente

Durch verschiedene Koinkubationsexperimente sollte gezielt die Beteiligung eines bestimmten Rezeptors der LDLR-Familie untersucht werden. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf das LRP gelegt.

In einem ersten Koinkubationsexperiment wurden die bEnd3-Zellen mit den verschiedenen Nanopartikeln und gleichzeitig mit „Low Density Lipoprotein“ (LDL) inkubiert. Als Referenz wurden Zellen eingesetzt, die nur mit Nanopartikeln inkubiert waren. Zunächst konnte das schon in den Bindungs-Studien beobachtete spezifische Targeting der ApoE-modifizierten Nanopartikel gegenüber den PEGylierten Kontroll-Partikeln bestätigt werden (Tab.8). Die Koinkubation der Nanopartikel mit LDL führte zu einer erhöhten Anzahl positiver Zellen mit einer Steigerung von 31,19 % auf 42,61 % positiver Zellen für die spezifischen ApoE-modifizierten Nanopartikel und einer geringeren Steigerung für die unspezifischen Nanopartikel (von 3,28 % auf 4,52 % positiver Zellen) (Tab.8).

Tab.8 Koinkubation der bEnd3-Zellen mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen und LDL.

	NP-Inkubation % positive Zellen	Koinkubation NP + LDL % positive Zellen
NP-ApoE	31,19	42,61
NP-PEG	3,28	4,52
Zellen ohne NP	1,73	1,14*

*: Zellen ohne NP-Inkubation, aber mit LDL.

Eine Erweiterung dieses ersten Versuches mit dem „Receptor Associated Protein“ (RAP) führte zu einer deutlichen Reduktion der positiven Zellen für die spezifischen ApoE-modifizierten Nanopartikel (von 25,05 % auf 7,05 % positive Zellen). RAP blockiert alle Bindungsstellen an den meisten Rezeptoren der LDLR-Familie, zu der LRP gehört. Dagegen erhöhte sich die Bindung der unspezifischen Nanopartikel an die bEnd3-Zellen leicht von 3,21 % auf 8,39 % positive Zellen (Tab.9).

Tab.9 Koinkubation der bEnd3-Zellen mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen und LDL + RAP.

	NP-Inkubation	Koinkubation NP + LDL + RAP
	% positive Zellen	% positive Zellen
NP-ApoE	25,02	7,05
NP-PEG	3,21	8,39
Zellen ohne NP	1,10	2,03*

*: Zellen ohne NP-Inkubation, aber mit LDL + RAP.

In einem weiteren Koinkubationsexperiment wurden die Zellen mit Nanopartikeln und löslichen Fragmenten des LRP inkubiert. Diese Fragmente enthielten genau die Bindungsdomänen II bzw. IV des LRP (LRP Dom II bzw. LRP Dom IV), um herauszufinden, welche Bindungsdomäne bei der spezifischen ApoE-vermittelten Bindung der Nanopartikel an die Zellen beteiligt ist. Mit beiden Fragmenten kam es zu einer Hemmung der spezifischen Partikel-Bindung, wobei die Inkubation mit LRP Dom IV mit 0,47 % positiver Zellen stärkere hemmende Effekte zeigte als die LRP Dom II mit 10,37 % positiver Zellen gegenüber der nur mit Nanopartikeln inkubierten Kontrolle (16,12 % positive Zellen) (Tab.10). Auch bei diesem Experiment war eine leichte Erhöhung des unspezifischen Bindungs-Anteils zu erkennen.

Tab.10 Koinkubation der bEnd3-Zellen mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen und LRP Dom II bzw. LRP Dom IV.

	NP-Inkubation	Koinkubation NP + LRP Dom II	Koinkubation NP + LRP Dom IV
	% positive Zellen	% positive Zellen	% positive Zellen
NP-ApoE	16,12	10,37	0,47
NP-PEG	1,39	2,21	1,62

Die Ergebnisse des Blut-Hirn-Schranken-Targetings mit unbeladenen Apolipoprotein-modifizierten HSA-Nanopartikeln sind teilweise publiziert in:

ZENSI, A., BEGLEY, D., PONTIKIS, C., LEGROS, C., MIHOREANU, L., **WAGNER, S.**, BÜCHEL, C., VON BRIESEN, H., KREUTER, J.: „Apolipoprotein E enables brain uptake of nanoparticles by transcytosis“. Journal of Controlled Release 2009, 137, 78 – 86

4.2.2. Apolipoprotein-modifizierte beladene Nanopartikel: gezielter Wirkstofftransport über die Blut-Hirn-Schranke

4.2.2.1. Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel

Die Nanopartikel auf humanem Serumalbumin-Basis (HSA) zum gezielten Wirkstofftransport über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) wurden prinzipiell nach dem in Abb.9 schematisch beschriebenen Verfahren synthetisiert. Allerdings wurden diese Partikel mit dem Wirkstoff Obidoxim, aus der Wirkstoffklasse der Oxime, beladen und mit Apolipoprotein E (ApoE) spezifisch modifiziert. Die unmodifizierten Obidoxim beladenen Nanopartikel (NP-Oxim) hatten eine durchschnittliche Größe von $297,0 \pm 37,5$ nm. Nach der Modifikation mit ApoE (NP-Oxim-ApoE) oder PEG (NP-Oxim-PEG) veränderte sich die Größe auf $312,0 \pm 23,6$ nm bzw. $301,3 \pm 30,7$ nm. Das Zetapotential der Partikel lag zwischen $-33,6 \pm 7,6$ und $-44,1 \pm 7,5$. Der Polydispersitätsindex war immer kleiner als 0,1. Das bedeutete, dass eine sehr gleichmäßige monodisperse Partikelgrößenverteilung vorlag. Der Nanopartikel-Gehalt lag zwischen $19,8 \pm 5,9$ mg/ml und $52,2 \pm 6,0$ mg/ml mit einer durchschnittlichen Beladung von $22,0 \pm 2,0$ µg Obidoxim pro mg HSA-Nanopartikel (Tab.11). Da die adsorptive Beladung der Nanopartikel immer frisch vor der Testung in der Zellkultur an bereits charakterisierten Formulierungen durchgeführt wurde, wurden die adsorptiv beladenen Partikel nicht weiter physikochemisch charakterisiert.

Tab.11 Physikochemische Charakterisierung der inkorporativ beladenen ApoE-modifizierten, PEGylierten und unmodifizierten HSA-Nanopartikel.

HSA-Nanopartikel		kovalente Bindung von ApoE	PEGyliert	unmodifiziert
		NP-Oxim-ApoE	NP-Oxim-PEG	NP-Oxim
Partikeldurchmesser	[nm]	$312,0 \pm 23,6$	$301,3 \pm 30,7$	$297,0 \pm 37,5$
Polydispersität		$0,052 \pm 0,023$	$0,048 \pm 0,012$	$0,064 \pm 0,016$
Zetapotential	[mV]	$-33,6 \pm 7,6$	$-36,4 \pm 7,8$	$-44,1 \pm 7,5$
Partikelgehalt	[mg/ml]	$19,8 \pm 5,9$	$41,1 \pm 10,8$	$52,2 \pm 6,0$
Beladung	[µg/mg]	$22,0 \pm 2,0$	$22,0 \pm 2,0$	$22,0 \pm 2,0$

4.2.2.2. Bindungs-Studie

Zunächst musste auch für diese Partikel die zelluläre Bindung und Aufnahme geklärt werden.

Zur Klärung der zellulären Bindung wurden die Maus-Gehirnendothelioma-Zellen bEnd3 entweder mit 0,1 mg/ml der spezifischen Oberflächen-modifizierten ApoE-Nanopartikel (NP-Oxim-ApoE) und den entsprechenden PEGylierten Kontroll-Nanopartikeln (NP-Oxim-PEG) oder mit den unspezifischen unmodifizierten Nanopartikeln (NP-Oxim) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die anschließende durchflusszytometrische Analyse ergab 66,14 % positive Zellen für die mit den ApoE-modifizierten Nanopartikeln inkubierten Zellen und 24,33 % für die mit den dazugehörigen PEGylierten Kontroll-Partikeln inkubierten Zellen. Die gänzlich unmodifizierten Nanopartikel zeigten mit 85,62 % positiver Zellen den höchsten zellulären Bindungsanteil (Abb.34).

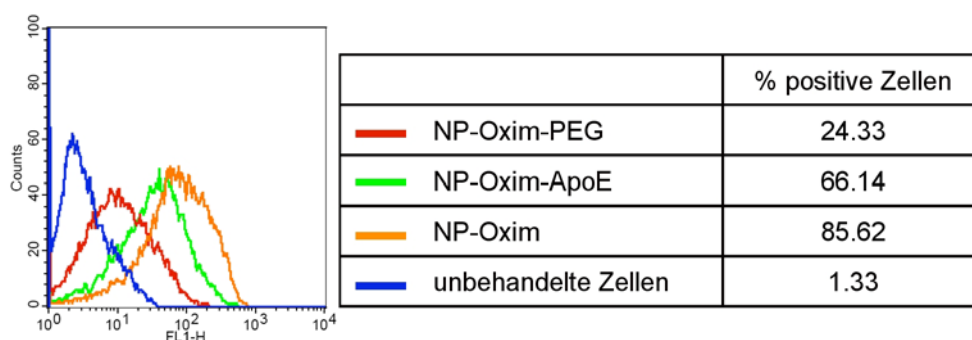


Abb.34 Zelluläre Bindung der Obidoxim-beladenen Nanopartikel.

bEnd3-Zellen wurden mit den **verschiedenen Obidoxim-beladenen Nanopartikeln** für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die zelluläre Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind sowohl als Histogramme des FL1-H-Kanals (Autofluoreszenzbereich der Nanopartikel) gezeigt als auch als Tabelle mit der Prozentzahl positiver Zellen dargestellt. Rot: NP-Oxim-PEG; grün: NP-Oxim-ApoE; orange: NP-Oxim; blau: unbehandelte Zellen.

4.2.2.3. Intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung

Die zelluläre Aufnahme und die subzelluläre Verteilung dieser nanopartikulären Formulierungen wurden mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie untersucht. Die bEnd3-Zellen wurden entweder mit 3 mg/ml der spezifischen Nanopartikel NP-Oxim-ApoE und den korrespondierenden Kontroll-Nanopartikeln NP-Oxim-PEG oder mit den unspezifischen Nanopartikeln NP-Oxim für 4 h bei 37 °C inkubiert (Abb.35). Die grüne Autofluoreszenz der spezifisch aufgenommenen NP-Oxim-ApoE war deutlich im Zellinneren, im rot gefärbten Zytosol der Zellen, zu erkennen (Abb.35c). Dagegen

konnten nur wenige unspezifischen NP-Oxim-PEG detektiert werden (Abb.35d). Die größte Nanopartikel-Aufnahme konnte mit den unmodifizierten Partikeln (NP-Oxim) beobachtet werden (Abb.35b).

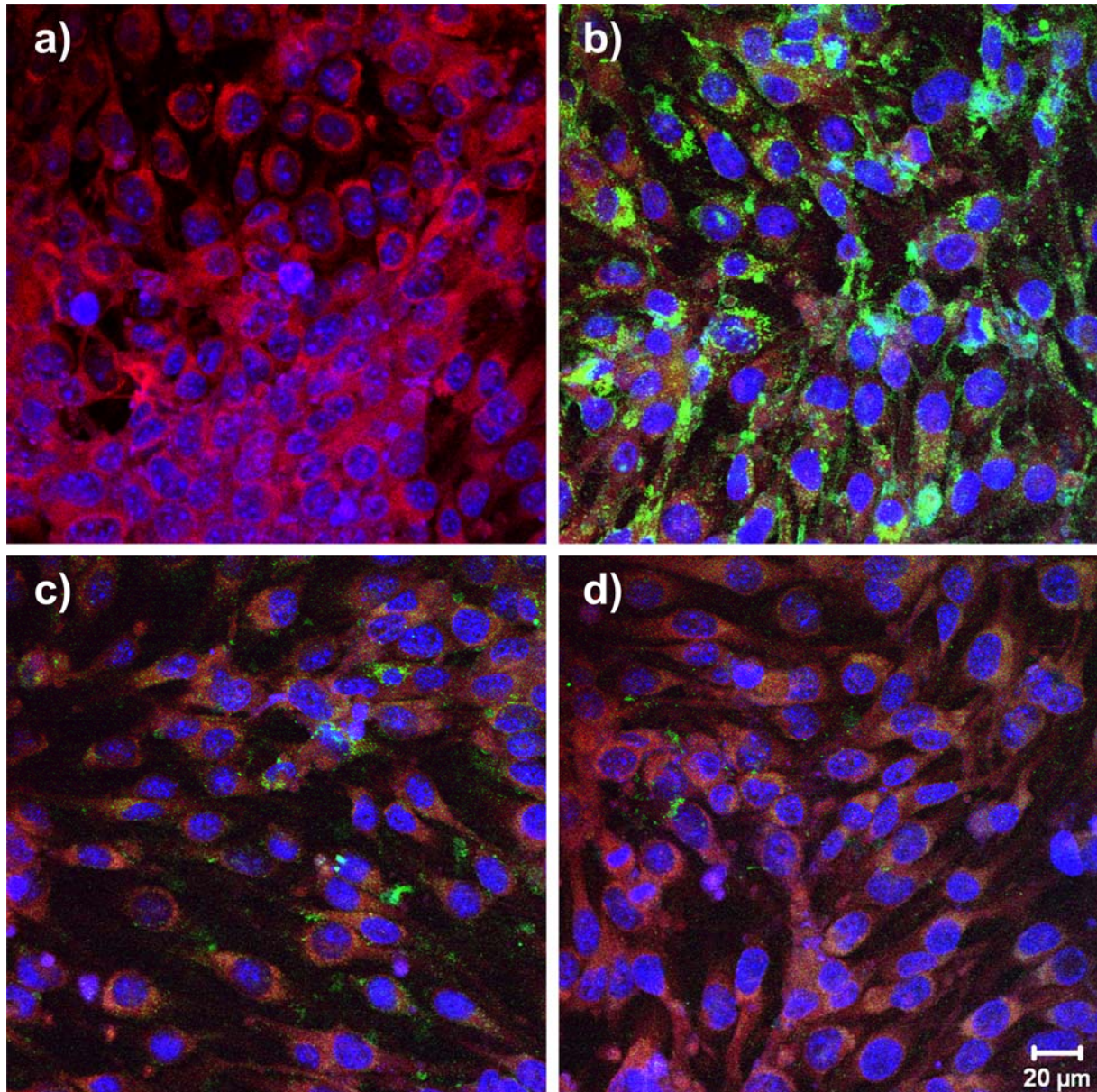


Abb.35 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der Obidoxim-beladenen Nanopartikel untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie.

bEnd3-Zellen wurden mit 3 mg/ml der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die grüne Autofluoreszenz der Nanopartikel wurde für die Detektion genutzt. Das Zytosol wurde mit CellTracker™ Red CMTPX rot und der Zellkern mit DAPI blau gefärbt. Die Bilder wurden in einer Schnittebene im Inneren der Zelle aufgenommen. **a) Kontrolle**, Zellen ohne Nanopartikel. **b)** Inkubation der Zellen mit **NP-Oxim**. **c)** Inkubation der Zellen mit den **spezifischen NP-Oxim-ApoE**. **d)** Inkubation der Zellen mit den **unspezifischen NP-Oxim-PEG**.

Die intrazelluläre Aufnahme der unmodifizierten Nanopartikel NP-Oxim wurde durch eine optische Schnittfolge in 1 μm Abstand durch Zellen, die mit diesen Nanopartikeln inkubiert waren, bestätigt (Abb.36).

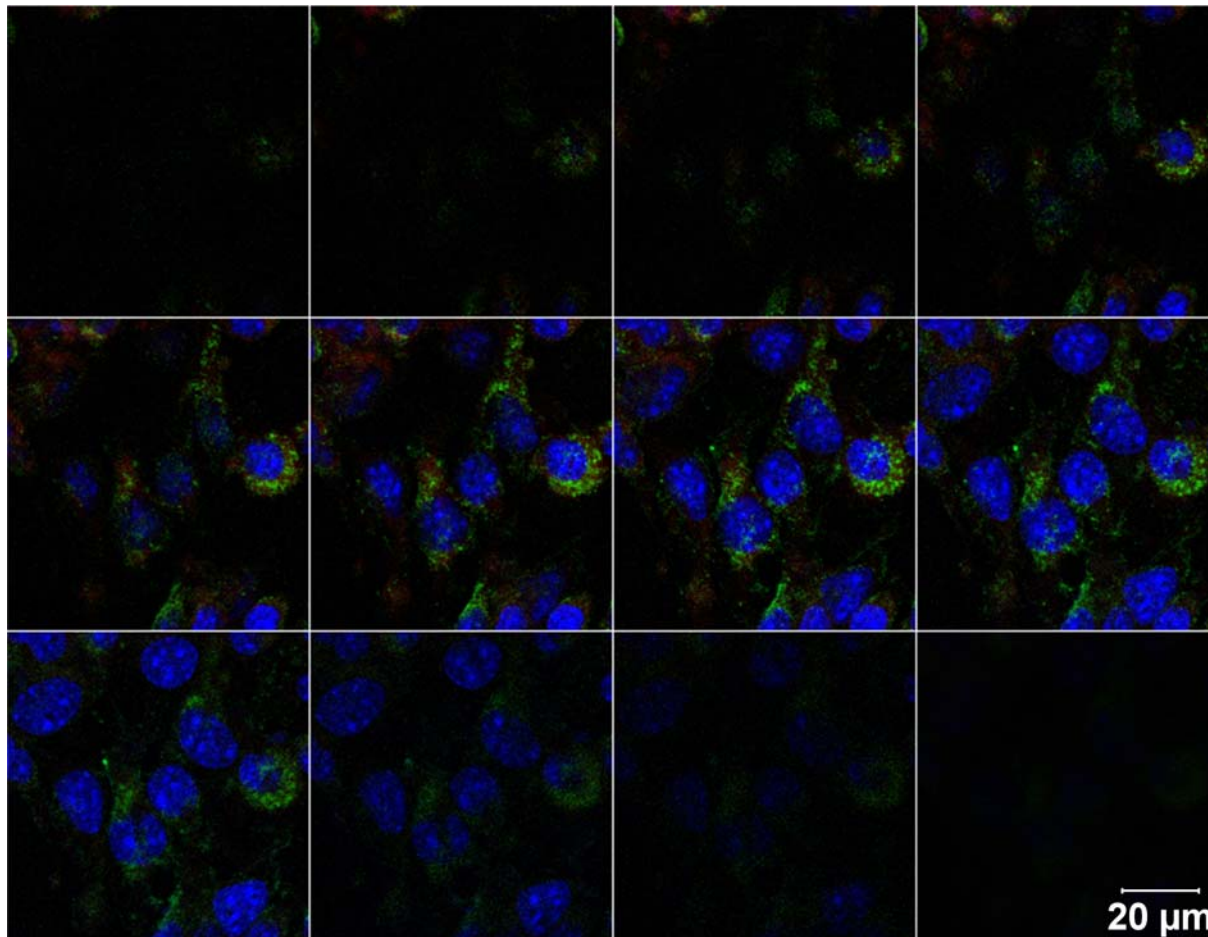


Abb.36 Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von NP-Oxim untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie: Schnittfolge.

bEnd3-Zellen wurden mit **NP-Oxim** für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die grüne Autofluoreszenz der Nanopartikel wurde für die Detektion genutzt. Das Zytosol wurde mit CellTracker™ Red CMTPX rot und der Zellkern mit DAPI blau gefärbt. Gezeigt ist eine Schnittfolge durch die Zellen in 1 μm Abstand.

4.2.2.4. Zellviabilitäts-Assay

Um jeglichen zytotoxischen Effekt dieser Nanopartikel und des freien Wirkstoffs Obidoxim auszuschließen, wurde die Zellviabilität mittels WST-1-Assay, nach Inkubation der Zellen mit den Nanopartikeln oder Obidoxim, bestimmt. Hierzu wurden frisch isolierte primäre porcine Gehirnkapillarendothel-Zellen (pBCEC) unter denselben Bedingungen kultiviert und ebenso mit denselben Nanopartikel-Konzentrationen für 24 h bei 37 °C inkubiert wie für die Transport- und Wirkstoff-Freisetzungs-Studien (siehe Abschnitt 4.2.2.6.). Die Zellviabilität wurde über

Absorptionsmessungen der Formazan-Bildung bestimmt. Die Formazan-Bildung findet nur in den Mitochondrien intakter Zellen statt. Daher stellten bei diesen Versuchen unbehandelte Zellen den Standard dar und wurden auf 100 % gesetzt. Alle weiteren Ergebnisse wurden darauf bezogen. Nach der Inkubation mit freiem Obidoxim oder den zusätzlich adsorptiv beladenen Oberflächen-modifizierten Nanopartikeln NP-Oxim-PEG ads. bzw. NP-Oxim-ApoE ads. zeigten die Zellen eine relative Formazan-Bildung und damit Viabilität von annähernd 100 % (zwischen 87,3 und 101,1 %) (Abb.37). Nur nach Inkubation mit den unmodifizierten zusätzlich adsorptiv beladenen Nanopartikeln war eine gesteigerte Formazan-Bildung über den Kontroll-Wert zu verzeichnen.

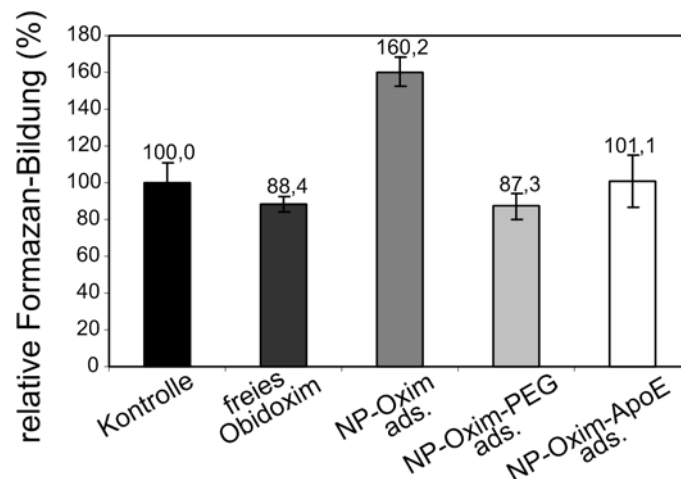


Abb.37 Zellviabilitäts-Assay: Vergleich zwischen den verschiedenen Obidoxim-beladenen nanopartikulären Formulierungen und freiem Obidoxim.

pBCEC wurden unter denselben Kulturbedingungen wie für die biologische Wirksamkeitstestungen in Kollagen IV-beschichteten 96-Loch-Platten kultiviert und mit den **verschiedenen Obidoxim-beladenen nanopartikulären Formulierungen** oder **freiem Obidoxim** für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellviabilität wurde nach Zugabe des WST-1-Reagenz durch Messung der Formazan-Bildung bestimmt. Unbehandelte Zellen wurden als Standard auf 100 % gesetzt.

4.2.2.5. Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands

Für die Wirkstofftransport- und Freisetzungs-Studien sollte ein möglichst adäquates *in vitro* BHS-Modell eingesetzt werden, um eine intakte Blut-Hirn-Schranke zu simulieren. Daher wurden für diese Untersuchungen frisch isolierte primäre porcine Gehirnkapillarendothel-Zellen (pBCEC) eingesetzt, deren Barriere-bildene Funktionalität anhand der Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands vor jedem Versuch überprüft wurde.

Frisch isolierte pBCEC wurden zur Simulation der Blut-Hirn-Schranke *in vitro* auf Kollagen IV-beschichteten Transwell-Inserts in serumhaltigem Medium kultiviert, bis die Kapazität (C_{cl}) auf ungefähr $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ gesunken war und der transendotheliale elektrische Widerstand (TER) langsam zu steigen begann. Dies war ein Zeichen für einen konfluenten Monolayer. Danach wurde auf ein serumfreies, Hydrocortison-haltiges Medium umgestellt, um eine weitere Steigerung des TER anzustoßen (Abb.38).

In vitro bilden primäre Gehirnkapillarendothel-Zellen keinen so hohen TER aus wie *in vivo*. Ein TER-Wert von $300 \Omega\text{cm}^2$ ist daher zur Simulation einer intakten BHS ausreichend und die Transport- und Wirkstoff-Freisetzungs-Studien konnten ab diesem Wert durchgeführt werden.

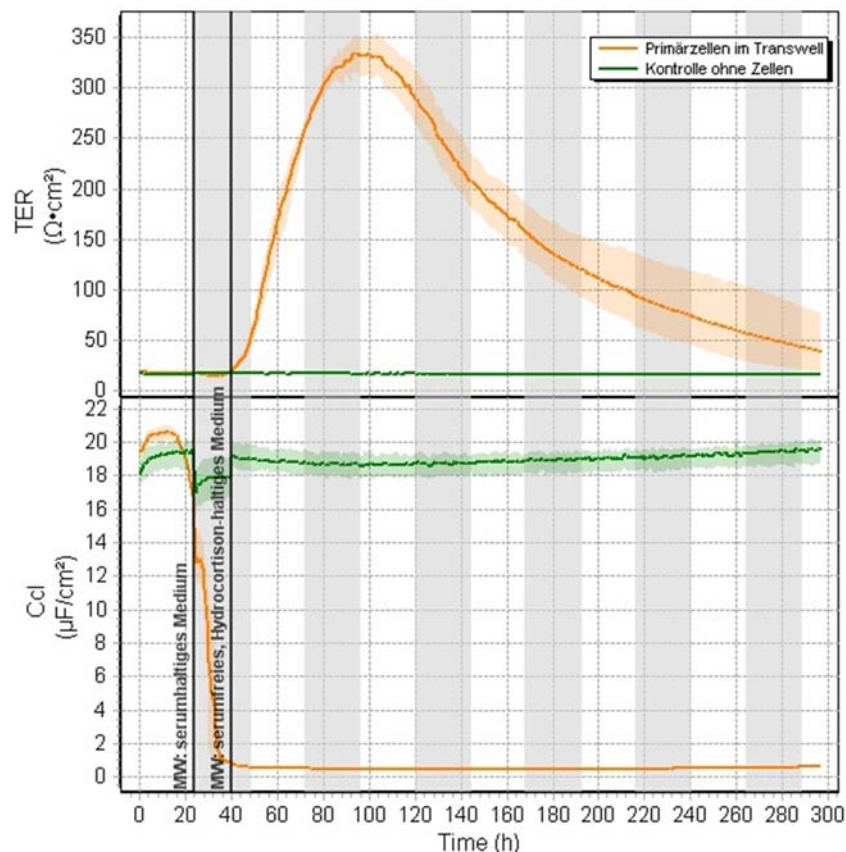


Abb.38 Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands frisch isolierter primärer porciner Gehirnkapillarendothel-Zellen.

pBCEC wurden direkt nach der Isolierung auf Kollagen IV-beschichteten Transwell-Inserts ausgesät und der transendotheliale elektrische Widerstand (TER) und die Kapazität (C_{cl}) mittels Impedanzmessungen bestimmt. Orange: TER- bzw. C_{cl} -Kurve von Primärzellen im Transwell; grün: Kontrollmessungen ohne Zellen im Transwell.

4.2.2.6. Transport- und Freisetzungs-Studie

Der Transport von funktionellem Obidoxim über das *in vitro* BHS-Modell und dessen Freisetzung wurde im Acetylcholinesterase-Enzym-Assay anhand der Reaktivierung von Organophosphat-vergifteter Acetylcholinesterase bestimmt.

Für diese Transport- und Freisetzungs-Studien wurden die Zellen, wie in Abschnitt 4.2.2.5. beschrieben, kultiviert und mit 1,56 mg NP/cm² Wachstumsfläche inkubiert. Zunächst wurden sowohl NP-Oxim, NP-Oxim-PEG und NP-Oxim-ApoE als auch die nanopartikulären Formulierungen, die zusätzlich adsorptiv beladen waren, untersucht. Weiterhin wurden die Zellen als Kontrolle mit derselben Konzentration an Obidoxim inkubiert, wie sie für die zusätzliche adsorptive Modifikation der Nanopartikel eingesetzt wurde. Nach 4 h Inkubationszeit wurde das Medium aus dem unteren, basolateralen Kompartiment gesammelt und der nanopartikuläre Transport und die Freisetzung des Obidoxims über den enzymatischen AChE-Assay bestimmt. Wie Abb.39a bestätigt, war der nanopartikuläre Transport über das *in vitro* BHS-Modell und die Freisetzung von funktionellem, aktivem Obidoxim prinzipiell möglich. Jedoch schienen nur die zusätzlich adsorptiv modifizierten Wirkstoff-beladenen Nanopartikel eine nachweisbare Obidoxim-Menge zu transportieren. Nur zwei dieser zusätzlich adsorptiv modifizierten nanopartikulären Formulierungen, die unspezifischen NP-Oxim ads. und die spezifischen NP-Oxim-ApoE ads., erreichten eine bessere Reaktivierung der Organophosphat-inhibierten AChE als freies Obidoxim. Die berechnete standardisierte Obidoxim-Konzentration betrug dabei für NP-Oxim ads. 10,23 µM und 14,43 µM für NP-Oxim-ApoE ads., im Vergleich zu 9,72 µM für den freien Wirkstoff Obidoxim (Abb.39b).

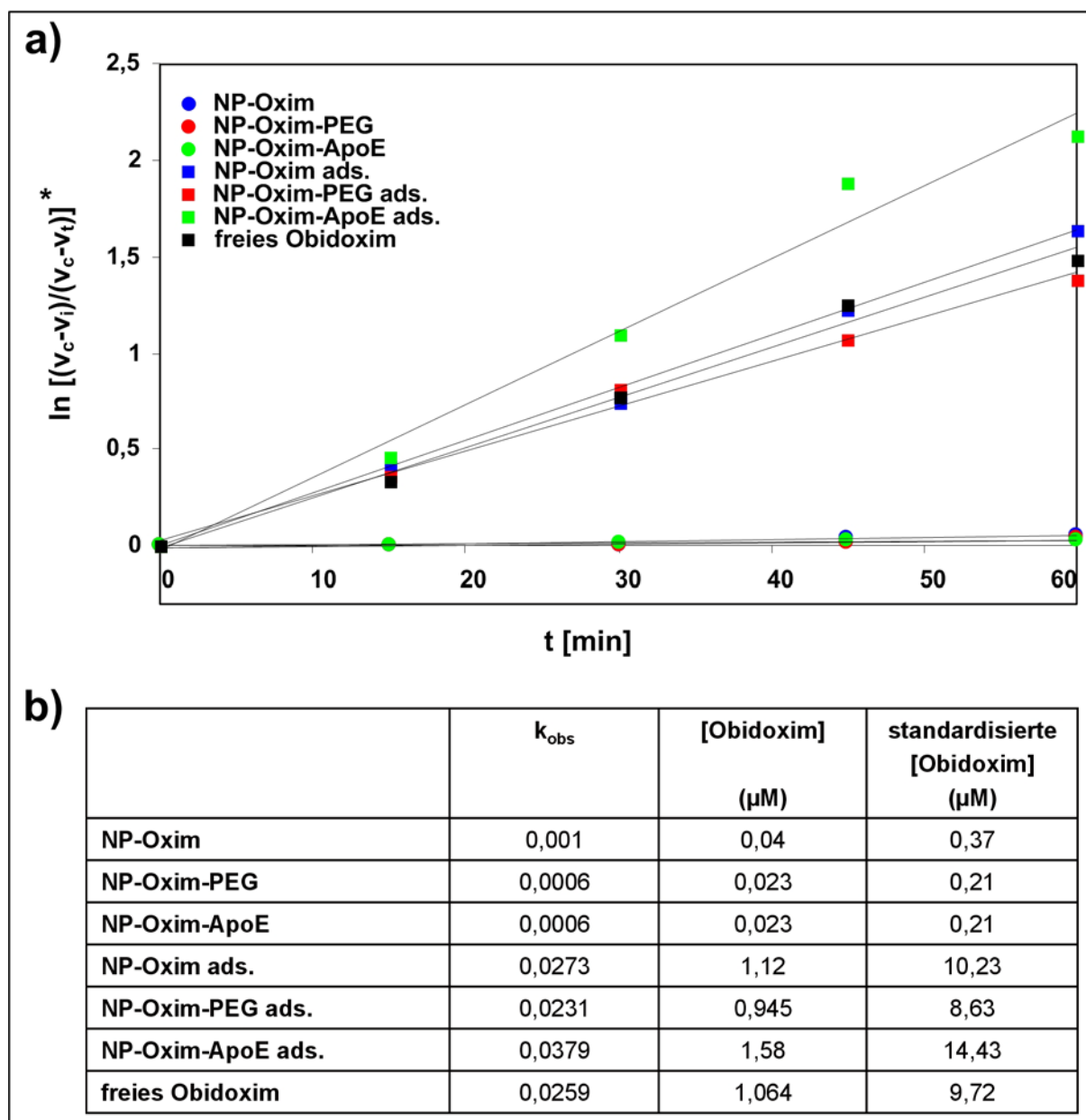


Abb.39 Biologische Wirksamkeitstestung: Transport- und Freisetzungsstudie der inkorporativ und zusätzlich adsorptiv beladenen Nanopartikel.

pBCEC wurden auf Kollagen IV-beschichteten Transwell-Inserts ausgesät und durch Zugabe in das obere, apikale Kompartiment des Transwell-Systems mit den verschiedenen sowohl **Obidoxim-inkorporierten** als auch **zusätzlich adsorptiv beladenen nanopartikulären Formulierungen** sowie **freiem Obidoxim** für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach 4 h wurde das Medium aus dem unteren, basolateralen Kompartiment gesammelt und der Transport und die Freisetzung des Wirkstoffs Obidoxim wurden über die Reaktivierung Organophosphat-inhibierter Acetylcholinesterase spektrophotometrisch gemessen. a) Messdaten; b) Berechnung der transportierten Obidoxim-Konzentration; *: siehe Gleichung 2 (Abschnitt 3.2.2.7.).

In einem weiteren Transport- und Freisetzungs-Experiment mit Nanopartikeln, die keine inkorporative Wirkstoff-Beladung trugen, sondern nur adsorptiv modifiziert waren, konnte ebenso der Obidoxim-Transport über das *in vitro* BHS-Modell gezeigt werden (Abb.40). Die transportierte standardisierte Obidoxim-Konzentration erreichte

Werte von 13,06 - 31,24 μM und war damit genauso hoch oder sogar höher als mit den Wirkstoff-beladenen adsorptiv-modifizierten Nanopartikeln.

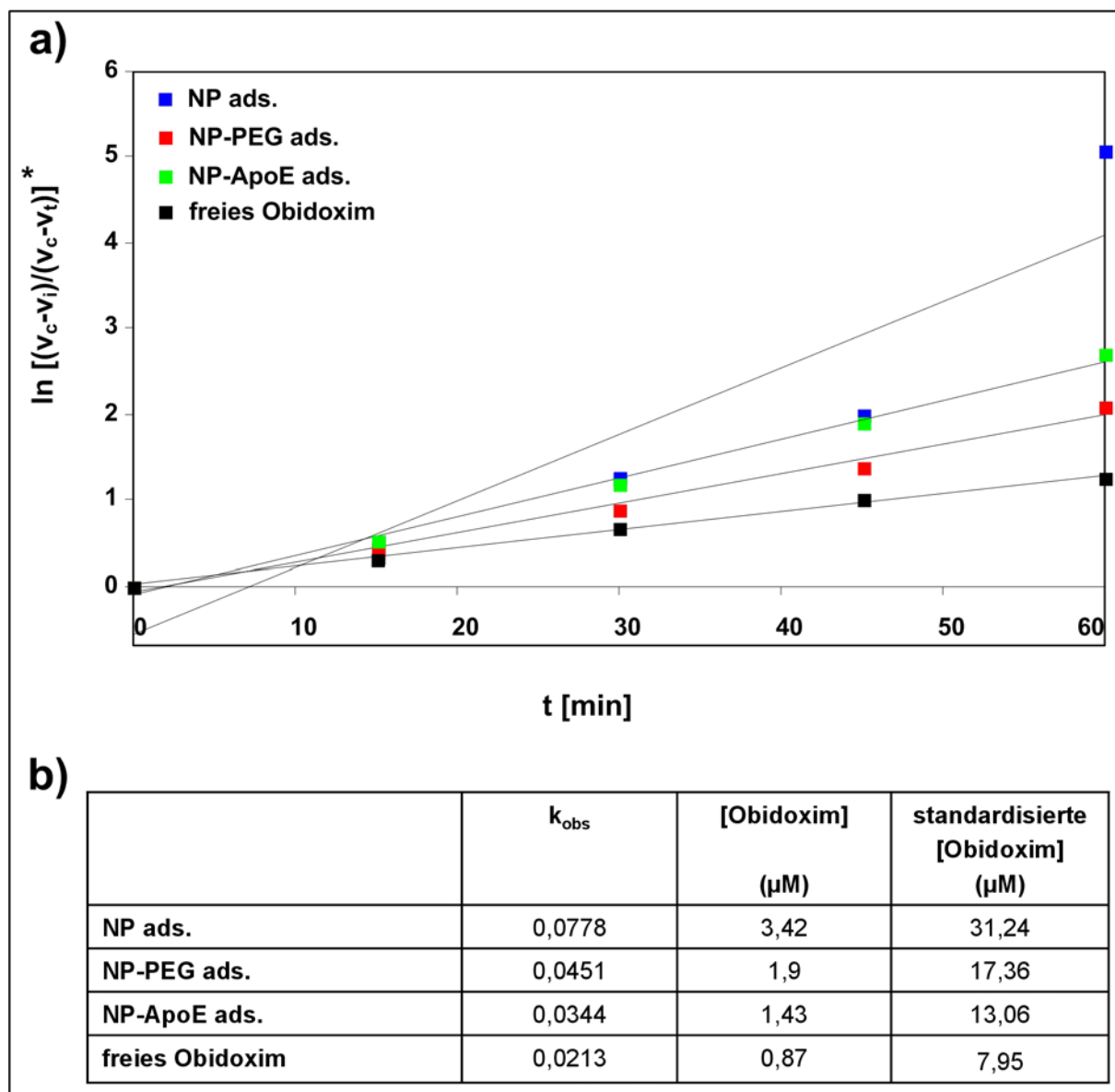


Abb.40 Biologische Wirksamkeitstestung: Transport- und Freisetzungsstudie der adsorptiv beladenen Nanopartikel.

pBCEC wurden auf Kollagen IV-beschichteten Transwell-Inserts ausgesät und durch Zugabe in das obere, apikale Kompartiment des Transwell-Systems mit den verschiedenen **adsorptiv beladenen nanopartikulären Formulierungen** sowie **freiem Obidoxim** für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach 4 h wurde das Medium aus dem unteren, basolateralen Kompartiment gesammelt und der Transport und die Freisetzung des Wirkstoffs Obidoxim wurden über die Reaktivierung Organophosphat-inhibierter Acetylcholinesterase spektrophotometrisch gemessen. a) Messdaten; b) Berechnung der transportierten Obidoxim-Konzentration; *: siehe Gleichung 2 (Abschnitt 3.2.2.7.).

5. Diskussion

5.1. Nanopartikel zum spezifischen Tumor-Targeting

Das spezifische Targeting von Tumorzellen, um höhere Wirkstoff-Konzentrationen im Zielgewebe bei geringerer Dosierung des Wirkstoffs und gleichzeitiger Minimierung unerwünschter Nebenwirkungen zu erreichen, ist eines der angestrebten Hauptziele der Tumorthherapie. Nanopartikuläre Arzneistoffsysteme, die mit einem anti-tumoralen Wirkstoff beladen und durch Anknüpfung eines zellspezifischen Liganden zielgerichtet-modifiziert werden, sind viel versprechende Ansatzpunkte dieses Ziel zu verwirklichen. Häufig werden hierzu monoklonale Antikörper eingesetzt, die schon eine Zulassung als therapeutische Antikörper haben [68-72].

Mammakarzinom-Zellen-Targeting

Der monoklonale Antikörper Trastuzumab, zugelassen zur Behandlung von metastatisierendem Mammakarzinom [187], ist als zellspezifischer Ligand für das Mammakarzinom-Zellen-Targeting hervorragend geeignet. Er erkennt den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (HER2), der in adultem Gewebe nur gering vorhanden, aber in 30 % aller Magen-Darm-, Lungen- und Brusttumoren überexprimiert ist [188]. Doxorubicin-beladene Trastuzumab-modifizierte HSA-Nanopartikel sowie die dazugehörigen IgG-modifizierten Kontroll-Nanopartikel konnten nach einem etablierten Verfahren synthetisiert werden [44-46, 54, 173]. Die physikochemische Charakterisierung bestätigte eine durchschnittliche Partikelgröße von ungefähr 400 nm. Die Partikel lagen somit in dem für die Tumorthherapie relevanten Bereich, der durch die Fenestrierung der Blutkapillare im Tumor auf ungefähr 600 nm begrenzt ist. Die Polydispersität dieser Partikel lag unter 0,1, was für eine monodisperse, homogene Partikelgrößenverteilung sprach. Somit waren diese Partikel für eine präklinische Testung in *in vitro* Versuchen geeignet.

Zunächst konnte die spezifische zelluläre Bindung der Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel gegenüber den unspezifischen Kontroll-Partikeln an HER2-überexprimierende Mammakarzinom-Zellen SK-Br-3 durch Durchflusszytometrie-Analysen bestätigt werden. Kontroll-Experimente mit Mammakarzinom-Zellen, die den HER2-Rezeptor nur gering exprimierten (MCF-7), zeigten dagegen keinen Unterschied in der zellulären Bindung der Trastuzumab- oder IgG-modifizierten

Nanopartikel. Daher war mit diesen Trastuzumab-modifizierten Nanopartikeln ein sehr spezifisches Targeting des HER2-Rezeptors möglich, und die HER2-gering-exprimierende Mammakarzinom-Zellen MCF-7 eigneten sich für entsprechende Kontroll-Experimente.

Die intrazelluläre Aufnahme und die subzelluläre Verteilung dieser nanopartikulären Formulierungen konnten mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie (CLSM) gezeigt werden. Trastuzumab-modifizierte Nanopartikel reicherten sich dabei spezifisch intrazellulär in den HER2-überexprimierenden Mammakarzinom-Zellen an. Die IgG-modifizierten Kontroll-Nanopartikel hafteten dagegen äußerlich an der Zellmembran. Die Durchflusszytometrie- und CLSM-Daten bestätigten das spezifische Targeting und die intrazelluläre Aufnahme der Trastuzumab-modifizierten Doxorubicin-beladenen Nanopartikel.

Ein weiterer Schritt war die Überprüfung des spezifischen Transports des Zytostatikums Doxorubicin mit diesen nanopartikulären Formulierungen in die Krebszellen, dessen Freisetzung und der Nachweis der biologischen Aktivität. Hierzu musste erst geklärt werden, ob die Durchflusszytometrie eine geeignete Methode ist, um in Wirkstoffwiederfindungs-Experimenten verschiedene intrazelluläre Doxorubicin-Konzentrationen zu detektieren und zu unterscheiden. Die rote Autofluoreszenz des Doxorubicins konnte genutzt werden, um zu zeigen, dass freies, nicht nanopartikulär gebundenes Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen intrazellulär zu detektieren und zu unterscheiden war. Somit war die Durchflusszytometrie prinzipiell für Wirkstoffwiederfindungs-Experimente einsetzbar.

Wurden die HER2-überexprimierenden Mammakarzinom-Zellen mit verschiedenen Doxorubicin-beladenen nanopartikulären Formulierungen oder freiem Doxorubicin inkubiert, so konnte anhand der Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse gezeigt werden, dass verschiedene Mengen an Doxorubicin in die Zellen transportiert wurden. Wegen ihrer spezifischen zellulären Aufnahme transportierten die Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel mehr Doxorubicin in die Zellen als die unspezifischen IgG-modifizierten Kontroll-Nanopartikel. Allerdings wurde durch die Inkubation mit freiem Doxorubicin zunächst am meisten Doxorubicin in die Zellen aufgenommen. Diese unspezifische Zytostatika-Aufnahme aller Zellen ist jedoch ein bekanntes Phänomen und der Grund für die unerwünschten Nebenwirkungen während einer Doxorubicin-basierten Tumor-Therapie. Daher ist es von besonderer Bedeutung, Zytostatika nanopartikulär zu verpacken und zielgerichtet an ihren Wirk-

ort zu transportieren. Die richtige Dosierung des Zytostatikums am Wirkort spielt dabei eine weitere wichtige Rolle. In den *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Konzentration des Wirkstoffs am Wirkort auch über die Beladung der Nanopartikel mit Arzneistoff zu beeinflussen war. Höher beladene Nanopartikel transportierten auch mehr Doxorubicin in die Zelle. Die Beladung der Nanopartikel mit Doxorubicin beeinflusste dagegen nicht die Bindungs-Effizienz der Nanopartikel. Die Trastuzumab-modifizierten Doxorubicin-beladenen Nanopartikel (NP-Dox-Trastuzumab) zeigten weiterhin eine gleich bleibende spezifische zelluläre Bindung an die HER2-überexprimierenden SK-Br-3-Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass auch über die Beladung des nanopartikulären Arzneistoffträgers und nicht nur über die eingesetzte Nanopartikel-Menge eine Möglichkeit besteht, die Konzentration des Wirkstoffs am Wirkort zu beeinflussen. Für die Nanopartikel-basierte Tumor-Therapie ist es nämlich von großer Bedeutung, hoch beladene Formulierungen einsetzen zu können, um ein kleines Arzneistoff-Infusions-Volumen zu erreichen.

Durch eine gleiche Inkubationszeit der HER2-überexprimierenden SK-Br-3-Zellen mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen und anschließender verschiedener Kultivierungszeiten bis zur durchflusszytometrischen Analyse sollte in weiteren Wiederfindungs-Experimenten die zelluläre Doxorubicin-Prozessierung untersucht werden. Es bestätigte sich zwar, dass durch Zugabe des freien Wirkstoffs Doxorubicin am meisten Doxorubicin in die Zelle transportiert wurde, aber es zeigte sich auch, dass ein schnellerer Rückgang des Doxorubicin-Signals bei dem freien Doxorubicin im Vergleich zu den NP-Dox-Trastuzumab zu erkennen war. Eine Erklärung hierfür könnten die Efflux-Pumpen der Zellen sein, die den freien Wirkstoff Doxorubicin aus der Zelle pumpen. Dagegen ist nanopartikulär verpacktes Doxorubicin geschützt [173, 189, 190] und wird erst später aus den Nanopartikeln in die Zelle freigesetzt. Dieser „Sustained Release“-Effekt könnte hilfreich sein, um die benötigten Doxorubicin-Mengen für die Tumorthherapie und somit auch die unerwünschten Nebenwirkungen zu verringern.

In weiteren Versuchen musste nun die tatsächliche Freisetzung des Doxorubicins aus dem Partikel-System in seiner aktiven Form gezeigt werden. Dies ließ sich anhand seiner biologischen Wirksamkeit demonstrieren. Die spezifischen Trastuzumab-modifizierten Nanopartikel wurden nicht nur besser als die unspezifischen IgG-modifizierten Kontroll-Partikel in die HER2-überexprimierenden SK-Br-3-Zellen aufgenommen, sondern sie reduzierten auch die Zellviabilität signifikant. Das heißt,

dass das Zytostatikum Doxorubicin mit Hilfe dieser Partikel spezifisch in die Zelle transportiert wurde, dort in aktiver Form freigesetzt wurde und wirken konnte. Um sicherzustellen, dass nicht ein Großteil der Nanopartikel und damit auch das nanopartikelär transportierte Doxorubicin durch die zelluläre Aufnahme der Partikel über die Endosomen in diesen akkumulierten und somit nicht freigesetzt wurden, wurden die Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit in Anwesenheit des Endosomen-Hemmstoffs Chloroquin durchgeführt. Jedoch war kein signifikanter Unterschied bei der Versuchsdurchführung mit Chloroquin festzustellen. Das Partikel-System und der Wirkstoff Doxorubicin werden somit vollständig aus dem Endosom freigesetzt. In weiteren Vergleichsexperimenten zwischen Doxorubicin-beladenen und unbeladenen Trastuzumab-modifizierten Nanopartikeln konnte gezeigt werden, dass die Trastuzumab-Modifikation keinen biologischen Effekt auf die Zellen ausübte, sondern dass die biologische Aktivität der Trastuzumab-modifizierten Doxorubicin-beladenen Nanopartikel ganz auf die Doxorubicin-Beladung zurückzuführen war.

Die Spezifität dieses Trastuzumab-modifizierten Doxorubicin-beladenen HSA-basierten nanopartikelären Systems konnte nochmals anhand der Kontroll-Zellen MCF-7, die den Target-Rezeptor HER2/neu nur schwach exprimierten, bestätigt werden. Bei diesen Zellen war kein Unterschied in der biologischen Wirksamkeit der spezifischen und unspezifischen Nanopartikel zu erkennen, was auf die geringe unspezifische Aufnahme dieser Partikel zurückzuführen war.

In früheren Arbeiten wurde der Herstellungs-Prozess für die Nanopartikel auf Grundlage von HSA optimiert und etabliert [44]. Es konnte zum einen schon gezeigt werden, dass diese HSA-basierten Nanopartikel sehr schnell nach Aufnahme in die Zelle abgebaut werden und, dass sie eine signifikante zelluläre Anreicherung des inkorporierten Wirkstoffs bewirken [48, 191]. Daher wurde der Herstellungs-Prozess für diese Partikel weiterentwickelt, um sie mit dem Zytostatikum Doxorubicin beladen zu können [173]. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass mit Trastuzumab-modifizierten Nanopartikeln eine spezifische Aufnahme in HER2-überexprimierende Zellen möglich war [51, 54].

Bei den in dieser Arbeit getesteten nanopartikelären Formulierungen wurden erstmalig die Beladung mit einem Zytostatikum und die zielgerichtete Oberflächen-Modifikation in einem HSA-basierten Partikel-System zusammengeführt. Die Ergebnisse aus der präklinischen Testung in dieser Arbeit bestätigten die Spezifität und bio-

logische Aktivität dieser neu entwickelten zielgerichtet-modifizierten Doxorubicin-beladenen nanopartikulären Formulierung, basierend auf biologisch abbaubarem humanem Serumalbumin. Sie haben daher ein außerordentliches Potential, das große Ziel in der Krebsforschung, eine tumor-spezifische Chemotherapie und damit verbunden eine Reduzierung der unerwünschten Nebenwirkungen und Verbesserung der Lebensqualität der Betroffenen, zu erreichen.

Melanom-Zellen-Targeting

Für das spezifische Melanom-Zellen-Targeting wurde der sich in der klinischen Studie Phase I befindliche monoklonale Antikörper DI17E6 an die Oberfläche Doxorubicin-beladener HSA-Nanopartikel gekoppelt. DI17E6 ist gegen α_v -Integrine gerichtet. Somit war ein spezifisches Targeting von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiven Melanom-Zellen M21 möglich.

Der Nachweis der tatsächlichen DI17E6-Bindung an die Oberfläche des HSA-Partikel-Systems erfolgte indirekt über die IgG-Grundstruktur von DI17E6. Eine Reaktion von einem Gold-markierten anti-IgG-Sekundär-Antikörper mit dem an die Oberfläche gekoppelten DI17E6 konnte im Raster-Elektronen-Mikroskop gezeigt werden. Auf entsprechenden Raster-Elektronen-Mikroskop-Aufnahmen waren die Nanopartikel als graue Kugeln im Größenbereich von 200 nm zu erkennen. Die Bindung der DI17E6-Antikörper auf der Partikel-Oberfläche war durch Reaktion mit dem Gold-markierten Sekundär-Antikörper als kleine weiße Kugeln im Rückstreu-Elektronen (BSE)-Modus erkennbar.

Die spezifische zelluläre Bindung und Aufnahme der HSA-Nanopartikel, die mit dem α_v -spezifischen Antikörper DI17E6 modifiziert waren, in die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiven Melanom-Zellen M21 konnte gezeigt werden. Dagegen war keine spezifische Bindung an die α_v -defekten Melanom-Zellen M21L zu erkennen. Die Beladung der Nanopartikel mit dem Zytostatikum Doxorubicin hatte dabei keinen Einfluss auf diese Bindungs-Spezifität. Die Kontroll-Nanopartikel mit der unspezifischen IgG-Oberflächen-Modifikation zeigten, wie auch die Kontroll-Partikel für das Melanom-Zellen-Targeting, nur eine geringe unspezifische Bindung an die Zellen. Sie wurden kaum in die Zellen aufgenommen und hafteten größtenteils äußerlich an der Zellmembran. Die spezifische zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der α_v -spezifischen NP-Dox-DI17E6 konnte durch konfokale Raster-Lasermikroskopie bestätigt werden. Optische Schnitte durch die Zellen unterstrichen diesen Befund.

Weitere Untersuchungen mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen verdeutlichten die intrazelluläre Aufnahme des Partikel-Systems. Durch eine Anregungswellenlänge von 488 nm wurden kaum intrinsische Bestandteile der unbehandelten Zellen zur Fluoreszenz angeregt, aber intrazellulär aufgenommene Nanopartikel und Doxorubicin, da diese Anregungswellenlänge, wie schon in den vorherigen CLSM-Aufnahmen gezeigt, genau der Anregungswellenlänge für die HSA-Nanopartikel und Doxorubicin entsprach. Nach einer Zwei-Photonen-Anregung bei 750 nm waren die unbehandelten Zellen zu detektieren, da bei dieser Wellenlänge intrazelluläres NAD(P)H zur Fluoreszenz im blauen Spektralbereich angeregt wird [192-195]. Dieses Fluoreszenzsignal kann durch das Vorhandensein von weiteren intrazellulären Fluorochromen verstärkt werden, wie es bei den mit Doxorubicin behandelten oder mit Nanopartikeln inkubierten Zellen zu sehen war. Daher konnte auch mit Hilfe dieses Messverfahrens die intrazelluläre Aufnahme der Nanopartikel bestätigt werden. Mit einer Zwei-Photonen-Anregung bei 960 nm konnte dagegen das intrazelluläre NAD(P)H nicht mehr zur Fluoreszenz angeregt werden, sondern nur noch die in die Zellen eingebrachten Fluorochrome. Da die mit Doxorubicin behandelten und die mit Nanopartikeln inkubierten Zellen ein Fluoreszenzsignal bei dieser Wellenlänge zeigten, sprach auch dies für die intrazelluläre Lokalisation der Nanopartikel.

Die Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse ermöglicht es, einzelne fluoreszierende Komponenten unabhängig von der Intensität und der Wellenlänge des Fluoreszenz-Signals anhand ihrer unterschiedlichen mittleren Lebenszeiten zu unterscheiden. Es wurde versucht, dies auf die beladenen und unbeladenen Nanopartikel und Doxorubicin anzuwenden, um damit eventuell eine intrazelluläre Freisetzung des Wirkstoffs nachzuweisen. Die verschieden behandelten Zellen zeigten zwar leicht unterschiedliche Lebenszeiten, aber diese waren nicht eindeutig voneinander zu trennen. Auch über die Falschfarben-Darstellung der Lebenszeit konnte keine eindeutige intrazelluläre Zuordnung der einzelnen Komponenten getroffen werden. Daher war diese Methode nicht geeignet, um den intrazellulären Transport und die Freisetzung des Doxorubicins aus dem Partikel-System zu zeigen.

Mit den bisher gezeigten Experimenten war die spezifische zelluläre Aufnahme der DI17E6-modifizierten HSA-Nanopartikel abgeklärt. In weiteren Schritten musste die biologische Aktivität des Partikel-Systems, das das inkorporierte Zytostatikum Doxorubicin spezifisch transportieren und in einer aktiven Form freisetzen sollte,

überprüft werden. Des Weiteren musste geklärt werden, ob der Antikörper DI17E6 durch seine Kopplung an die Oberfläche des Partikel-Systems seine Funktionalität beibehalten hatte. Dies geschah durch den Zell-Attachment- und Zell-Detachment-Assay. Beide Assays beruhen auf der Tatsache, dass die Zell-Anhaftung an Vitronektin (VN)-beschichteten Oberflächen hauptsächlich über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine vermittelt wird. Diese $\alpha_v\beta_3$ -Integrine werden auch Vitronektin-Rezeptoren genannt, was ihre enge Verbindung verdeutlicht. Daher führte die Blockierung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen zur Ablösung von bereits angehafteten Zellen oder verhinderte das Anhaften der Zellen auf den VN-beschichteten Oberflächen. Der freie Antikörper DI17E6 besitzt die Eigenschaft, genau diese $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Bindungsstellen auf den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiven Melanom-Zellen M21 zu blockieren und sogar ein Ablösen der Zellen zu induzieren. Es konnte sowohl im Zell-Attachment-Assay als auch im Zell-Detachment-Assay gezeigt werden, dass der Antikörper diese Eigenschaft beibehielt, als er auf die Partikeloberfläche kovalent gekoppelt wurde. Der geringe Einfluss der IgG-modifizierten Kontroll-Nanopartikel auf das Zell-„Attachment“ könnte durch eine Art räumliche Hinderung zu erklären sein, bei der die gleichzeitig inkubierten Nanopartikel durch ihre Anwesenheit im Kulturmedium eine reibungslose zeitnahe Anhaftung der Zellen im Versuchszeitraum störten. Die DI17E6-modifizierten Nanopartikel konnten auch ein „Detachment“ bereits angehafter Zellen auslösen, auch wenn dazu etwas höhere Konzentrationen als für den Zell-Attachment-Assay notwendig waren. Die Tatsache dass, die Zellen beim Zell-Attachment-Assay vereinzelt, noch nicht angehaftet im Medium schwammen und somit die Integrine auf der Zelloberfläche für eine Reaktion frei zugänglich waren, wo hingegen beim Zell-Detachment-Assay eine bestehende Bindung zwischen Zelle und VN-Oberfläche erst aufgelöst werden musste, erklärt die benötigten höheren Konzentrationen im Zell-Detachment-Assay. Auch die Doxorubicin-beladenen DI17E6-modifizierten Nanopartikel induzierten ein hoch signifikantes Ablösen der Zellen von den VN-beschichteten Oberflächen. Die Zytostatika-Beladung hatte keinen Einfluss auf die Funktionalität und Spezifität des Antikörpers. Diese Versuche an VN-beschichteten Oberflächen demonstrierten, dass der Antikörper DI17E6 während der Partikel-Synthese seine Aktivität nicht verlor.

Durchlicht-Zeitraffer-Aufnahmen der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiven Melanom-Zellen M21 nach Inkubation mit den verschiedenen nanopartikulären Verbindungen oder freiem Doxorubicin bestätigten die Ergebnisse des Zell-Detachment-Assays. Das zelluläre

Ablösen wurde sowohl von unbeladenen DI17E6-modifizierten Nanopartikeln als auch von den Doxorubicin-beladenen DI17E6-modifizierten Nanopartikeln induziert, wobei die beladenen Nanopartikel schneller wirksam waren. Ein zunächst überraschenderes Ergebnis war die Tatsache, dass die Doxorubicin-beladenen DI17E6-modifizierten Nanopartikel schneller den Zelltod auslösten als der freie Wirkstoff Doxorubicin. Eine Erklärung hierfür könnte zum einen die zusätzliche Wirkung des funktionalen Antikörpers DI17E6 auf der Partikeloberfläche sein. Da dieser Antikörper anti-angiogenetische und Tumor-Wachstums-hemmende Eigenschaften hat, unterstützte und verstärkte er möglicherweise das Zytostatikum in seiner anti-tumoralen Wirkung. Zum anderen könnte ein weiterer Grund die, beim Melanom-Zellen-Targeting schon erwähnten, zellulären Efflux-Pumpen sein, die in die Zelle diffundiertes Zytostatikum wieder ausschleusen. Durch nanopartikulär transportiertes Zytostatikum kann dieser Mechanismus besser umgangen werden [173, 189, 190]. Auch die IgG-modifizierten Doxorubicin-beladenen Kontroll-Nanopartikel lösten wegen der geringen unspezifischen zellulären Bindung, die schon anhand der Durchflussszytometrie-Experimenten und den CLSM-Daten gezeigt werden konnte, den Zelltod aus. Diese Wirkung trat jedoch nach der längsten Inkubationszeit und später als die Wirkung des freien Doxorubicins ein, was für eine sehr geringe unspezifische Doxorubicin-Aufnahme durch die Zellen nach NP-Dox-IgG Inkubation sprach.

Die IC_{50} -Werte des Zellviabilitäts-Assays unterstützten die Erkenntnisse einer höheren Zytotoxizität der Doxorubicin-beladenen Nanopartikel im Vergleich zu freiem Doxorubicin. Bei den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiven Melanom-Zellen M21 war eine geringere Konzentration der DI17E6-modifizierten Doxorubicin-beladenen Nanopartikel notwendig, um denselben Abfall der Zellviabilität zu induzieren als mit freiem Doxorubicin. Die DI17E6-modifizierten Doxorubicin-beladenen Nanopartikel sind somit im zellulären Doxorubicin-Transport effektiver als das freie Doxorubicin. Ein Grund dafür könnten abermals die bereits erwähnten Efflux-Pumpen sein, die durch nanopartikulär-verpacktes Doxorubicin umgangen werden. Die nicht vorhandene Wirkung der DI17E6-modifizierten Doxorubicin-beladenen Nanopartikel bei den α_v -defekten Melanom-Zellen M21L und die starke Wirkung bei den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiven Melanom-Zellen M21 bestätigten die Spezifität dieses Partikel-Systems. Die IgG-modifizierten Kontroll-Nanopartikel dagegen waren bei beiden Zelllinien im eingesetzten Konzentrationsbereich nicht wirksam. Dass völlig unmodifizierte Nanopartikel unspezifisch von Krebszellen, wie bei den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiven Melanom-

Zellen M21 und den α_v -defekten Melanom-Zellen M21L gesehen, aufgenommen werden, ist ein häufig beobachtetes Phänomen. Dies ist aber lange nicht so effektiv im Sinne einer späteren zielgerichteten Chemotherapie wie mit entsprechend Ligand-modifizierten Nanopartikeln.

All diese Ergebnisse bestätigten die Spezifität und biologische Aktivität der DI17E6-modifizierten Doxorubicin-beladenen HSA-Nanopartikel, die sogar effektiver waren als der freie Wirkstoff Doxorubicin. Daher sollte diese nanopartikuläre Formulierung zu einem Fortschritt in der Tumorthherapie führen. Mit DI17E6 und seinen bispezifischen Eigenschaften, die zum einen das Tumor-Wachstum hemmen und auf der anderen Seite die Angiogenese blockieren, ist ein Erfolg versprechender monoklonaler Antikörper für die Krebstherapie gefunden worden. Daher sollte nicht nur der freie Antikörper DI17E6, sondern auch die DI17E6-modifizierten Nanopartikel als doppelschneidige Waffe im Kampf gegen Krebs eingesetzt werden können.

Mit derartigen nanopartikulären Formulierungen, basierend auf biologisch abbaubarem humanem Serumalbumin und modifiziert mit entsprechenden zielgerichteten Liganden und anti-tumoralen Wirkstoffen, sollte also eine spezifische Tumorthherapie möglich sein.

In der Zukunft werden solche nanopartikulären Drug-Carrier einen bedeutenden und ständig steigenden Anteil in der Krebstherapie einnehmen. Die Suche nach neuen Tumor-Targets, Liganden und neuen Strategien für das zielgerichtete Erreichen des Tumors mit stabilen nanopartikulären Formulierungen wird die Forschung zukünftig besonders beschäftigen, um den Wirkstofftransport an den Tumor zu verbessern und gleichzeitig die unerwünschte Beeinflussung des Nachbargewebes und das Auftreten von Nebenwirkungen zu verringern.

Um sich diesem Ziel zu nähern, gibt es heutzutage schon einige nanostrukturierte Formulierungen (eine Zusammenfassung ist nachzulesen bei Haley et al. [189]), zum Beispiel die von der FDA zugelassenen liposomalen Doxorubicin-Formulierungen Doxil[®]/Caelyx[®] und Myocet[®]. Bei diesen Formulierungen wurde die Pharmakokinetik des eingebundenen Anthrazyklins Doxorubicin geändert und damit die vom Doxorubicin bekannten Nebenwirkungen auf das Herz reduziert [196-199]. Gleichzeitig konnte durch die Gabe des liposomal-gebundenen Doxorubicins eine 10-fach höhere Doxorubicin-Konzentration im Tumor gemessen werden im Vergleich zu der

Gabe von freiem Arzneistoff [200]. Es ist jedoch zu erwarten, dass das in dieser Arbeit getestete HSA-basierende Doxorubicin-beladene nanopartikuläre System wegen seiner Antikörper-Modifikation spezifischer und damit effektiver in der Tumorthherapie sein wird. Des Weiteren zeigen nanopartikuläre Formulierungen eine höhere Beladungskapazität bei einem niedrigeren „Leckverlust“ im Vergleich zu liposomalen Formulierungen. Auch die bessere Stabilität dieser Nanopartikel im Vergleich zu liposomalen Formulierungen ist bekannt.

Die erste HSA-basierte nanopartikuläre Formulierung ist Abraxane[®], welches von der FDA 2005 und von der EMEA 2008 für die Behandlung von metastatisierendem Brustkrebs zugelassen wurde. Diese 130 nm großen Partikel enthalten das schwer wasserlösliche Zytostatikum Paclitaxel [17, 201, 202]. Wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit waren der konventionellen Arzneimittel-Präparation (Taxol[®]) die Lösungsvermittler Ethanol und Cremophor EL zugesetzt. Diese verstärkten allerdings die Nebenwirkungen von Paclitaxel, was eine Prämedikation mit Antihistaminika und Glukokortikoiden nötig machte. Mit der nanopartikulären lösungsmittelfreien Formulierung konnten viele Vorteile in der Behandlung erreicht werden. Die intratumorale Paclitaxel Konzentration konnte um 33 % gesteigert werden, wobei das Infusionsvolumen und die Infusionsdauer reduziert werden konnten. Auch war keine Prämedikation der Patienten mehr nötig [201, 202].

5.2. Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) hat einerseits eine Schutzfunktion für das zentrale Nervensystem (ZNS). Sie trennt das ZNS von der peripheren Zirkulation und schützt es dadurch vor toxischen Substanzen. Andererseits verhindert die BHS damit aber auch den Transport vieler wichtiger Arzneistoffe in therapeutisch relevanten Konzentrationen vom Blut in das Gehirn, wie z.B. Zytostatika, Antibiotika, ZNS-aktive und viele andere Substanzen. In der Vergangenheit gab es verschiedene Strategien diese Barriere zu umgehen [115]. Ein sehr Erfolg versprechender Ansatz lieferte bisher die Nanotechnologie [36, 117, 118]. Bis zu jetzigen Zeitpunkt ist es gelungen, verschiedene nanopartikulär verpackte Wirkstoffe, mit verschiedenen chemischen Eigenschaften und medizinischen Wirkungen, wie z.B. Doxorubicin [119-121], Dalargin [117, 122, 123], Loperamid [124-126] und einige andere [123, 127, 128], über die BHS zu transportieren. Schon lange gibt es Hinweise darauf, dass besonders Apolipoprotein-modifizierte Nanopartikel sehr gut geeignet sind, Wirk-

stoffe über die BHS zu transportieren [126, 130]. Allerdings ist der Mechanismus wie diese Partikel die BHS überwinden und welche Rezeptoren eventuell daran beteiligt sind, noch nicht vollständig geklärt.

Transportmechanismus-Studien

Zur Aufklärung des nanopartikulären Transportmechanismus über die BHS wurden Apolipoprotein E-modifizierte HSA-Nanopartikel und entsprechende PEGylierte Kontroll-Partikel nach einem etablierten Synthese-Verfahren hergestellt. Die Partikel lagen in einem Größenbereich von 200 - 220 nm und die physikochemische Charakterisierung bestätigte eine monodisperse Größenverteilung. Die Partikel konnten also für entsprechende Mechanismus-Studien eingesetzt werden.

Zunächst wurde die zelluläre Bindung der ApoE-modifizierten Nanopartikel an die Maus-Gehirnendothelioma-Zellen bEnd3 mittels Durchflusszytometrie überprüft. Die ApoE-modifizierten Nanopartikel zeigten eine deutliche zelluläre Bindung, welche als spezifisch anzusehen war, auch wenn der entsprechende Rezeptor auf zellulärer Seite noch nicht eindeutig geklärt war. Die PEGylierten Kontroll-Partikel zeigten nur eine geringe, als unspezifisch zu betrachtende, zelluläre Bindung. Dieses Experiment wurde bei 37 °C durchgeführt, einer Temperatur, die für Erhaltung aller zellulären Funktionen üblicherweise wichtig ist. Wurde dieses Experiment dagegen bei 4 °C wiederholt, so konnte keine spezifische Bindung mehr festgestellt werden. Auch der unspezifische Bindungsanteil wurde so reduziert, dass die Histogramme der mit Nanopartikeln inkubierten Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse nicht mehr von unbehandelten Zellen zu unterscheiden waren. Bei dieser Temperatur sind alle aktiven, Energie-verbrauchenden Transportprozesse eingestellt. Diese Beobachtung sprach für einen aktiven endozytotischen Aufnahmemechanismus der Nanopartikel in die Zelle. Im Hinblick auf die Aufklärung des BHS-Targetings bedeutete dies, dass ein Rezeptor-vermittelter transzellulärer Aufnahmeweg der Nanopartikel über die Endothelzellen ins Gehirn vorliegen musste.

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme und subzellulären Verteilung der nanopartikulären Formulierungen wurde unter anderem die konfokale Raster-Lasermikroskopie eingesetzt. Hier war eine deutliche Anreicherung der spezifischen ApoE-modifizierten Nanopartikel im Zellinneren zu erkennen. Zum anderen konnte auch die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) zur Klärung der zellulären Aufnahme und intrazellulären Verteilung der ApoE-modifizierten Partikel beitragen. Die TEM-

Aufnahmen unbehandelter bEnd3-Zellen lieferten hochauflösende Bilder, auf denen verschiedene intakte zelluläre Kompartimente zu erkennen waren, aber keine elektronendichte runde Strukturen im Größenbereich der Nanopartikel. Solche dunklen Kugeln mit Partikel-Struktur waren innerhalb der Zelle nur nach Inkubation der Zellen mit den ApoE-modifizierten Nanopartikeln zu erkennen. Daher konnte mit dieser Methode die intrazelluläre Partikel-Aufnahme ebenfalls gezeigt werden. Dabei konnte bestätigt werden, dass die Maus-Gehirnendothelioma-Zellen „Pits“ formten, um die Partikel zu endozytieren. Danach waren die Nanopartikel in Vesikeln wiederzufinden, wobei es sich wahrscheinlich um Endosomen oder Lysosomen handelt.

Auf TEM-Aufnahmen nach *in vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, dass nach 15-minütiger Inkubation diese ApoE-modifizierten HSA-Nanopartikel in verschiedenen Hirnregionen und Neuronen wieder zu finden waren [203]. Die „Tight Junctions“ in den Gehirnregionen waren jedoch intakt geblieben. Das heißt, dass eine spezifische Aufnahme der ApoE-modifizierten Nanopartikel auf der luminalen Seite in die Endothelzellen stattgefunden haben musste, gefolgt von einem transzellulären Transport der Nanopartikel durch die Endothelzellen und einer Freisetzung der Nanopartikel auf der abluminalen Seite. Die PEGylierten Nanopartikel konnten dagegen auch nach 30-minütiger Inkubation nur in den Endothelzellen und nicht in den Hirnregionen wieder gefunden werden. Dies bestätigte die unselektive Aufnahme der PEGylierten Nanopartikel.

Diese Ergebnisse unterstützen frühere Annahmen [133, 135-137], dass der nanopartikuläre Transport von Wirkstoffen über die Blut-Hirn-Schranke ein Rezeptor-vermittelter endozytotischer Mechanismus ist, bei dem es zu einer selektiven Bindung zwischen ApoE und vermutlich einem Rezeptor aus der „Low Density Lipoprotein“ (LDL)-Rezeptor-Familie kommt. Untermuert wird diese Annahme durch Versuche mit Nanopartikeln, an die eine ApoE-verwandte „nonsense“ Sequenz gebunden wurde. Diese Partikel transportierten keinen Wirkstoff über die BHS [137]. Auch wenn sich die Inkubationszeiten und eingesetzten Nanopartikel-Konzentrationen in *in vivo* Experimenten grundsätzlich von *in vitro* Experimenten unterscheiden, muss davon ausgegangen werden, dass *in vitro* dieselben Rezeptoren angesprochen werden wie *in vivo*. Daher wurden weitere Experimente zur Aufklärung des Transportmechanismus der ApoE-modifizierten Nanopartikel in der Zellkultur durchgeführt.

Zunächst wurde ein Zellviabilitäts-Test mit den eingesetzten Nanopartikel-Konzentrationen von 0,1 - 2 mg/ml durchgeführt, um einen zytotoxischen Effekt dieser Partikel auszuschließen. Die relative Formazan-Bildung, und damit die Zellviabilität, lag dabei mit allen getesteten Formulierungen über dem Kontroll-Wert. Dies kann auf eine allgemeine Aktivierung der Zellen durch die Partikel hindeuten.

Nachdem nun erste Hinweise auf eine Beteiligung der LDL-Rezeptor-Familie bei der spezifischen Nanopartikel-Aufnahme vorlagen, wurde das „Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein“ (LRP), einem Mitglied der LDL-Rezeptor-Familie, ins Hauptaugenmerk gefasst. Es wurde zunächst der Rezeptorstatus der für die Mechanismusexperimente benutzten Maus-Gehirnendothelioma-Zellen bEnd3 überprüft. Die Zellen wurden aber auch auf die Expression verschiedener anderer Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie getestet. Sie exprimierten LRP sowie den „Low Density Lipoprotein Receptor“ (LDLR), Megalin und in geringerem Maße den ApoE-Rezeptor (ApoER). Somit konnten mit diesen Zellen entsprechende Experimente zur Klärung des Transportmechanismus durchgeführt werden.

Die Suche nach einem beteiligten Rezeptor gestaltete sich sehr schwierig, da einige Experimente zunächst zu widersprüchlichen Ergebnissen führten. Nach mehrfachen Wiederholungen ergab sich jedoch folgendes Bild bei der Aufklärung des Transportmechanismus: Die Koinkubation der bEnd3-Zellen mit den verschiedenen Nanopartikeln und LDL führte zu einer verstärkten Aufnahme der spezifischen ApoE-modifizierten Nanopartikel, d. h. die Koinkubation mit LDL stimulierte die Zellen zu einer erhöhten Aufnahme dieser Partikel. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Zellen durch das Überangebot von LDL einen entsprechenden Rezeptor für die Aufnahme des LDL verstärkt exprimieren, der gleichzeitig auch die Aufnahme der ApoE-modifizierten Nanopartikel unterstützt. Des Weiteren könnte die Anwesenheit von LDL eine Konformationsänderung der Struktur von ApoE induzieren, die zu einer besseren Bindung von ApoE an den Rezeptor führt, denn es ist bekannt, dass Lipid-freies ApoE nicht mit hoher Affinität an den LDL-Rezeptor bindet. Für eine solche Hoch-Affinitätsbindung ist erst eine Assoziation mit Lipiden, z.B. durch die Bindung mit Phospholipiden oder Lipoproteinen, notwendig [140, 204, 205]. Auch der Einfluss von „High Density Lipoprotein“ (HDL) und „Very Low Density Lipoprotein“ (VLDL) bei der Koinkubation mit Nanopartikeln wurde untersucht (Daten nicht gezeigt). Hier schien es eher zu einer Hemmung der Partikel-Aufnahme zu kommen, für die bisher noch keine eindeutige Erklärung gefunden wurde. Es ist jedoch bekannt, dass auch

die Lipid-Zusammensetzung der Lipoproteine Einfluss auf die Konformation des ApoEs und damit die Rezeptoraffinität hat [138]. *In vivo* ist ApoE in Lipoproteinen eher mit HDL und VLDL assoziiert. Eventuell kam es daher zu einer Bindung des nanopartikulär präsentierten ApoEs an HDL und VLDL und damit zu einer Blockade des Liganden.

In weiterführenden Koinkubationsexperimenten mit dem „Receptor Associated Protein“ (RAP) konnte nicht nur der stimulierende Einfluss von LDL rückgängig gemacht werden, sondern sogar die spezifische Partikel-Aufnahme deutlich inhibiert werden. Dagegen wurde die Bindung der unspezifischen Nanopartikel an die bEnd3-Zellen leicht erhöht. RAP ist ein Protein, das alle Bindungsstellen an den meisten Rezeptoren der LDLR-Familie unspezifisch blockiert. Zu dieser Rezeptor-Gruppe gehört auch das LRP, denn RAP ist ein Chaperon für LRP und sorgt intrazellulär durch Bindung an die Liganden-Bindungsstellen für eine korrekte Faltung des LRP und verhindert eine frühzeitige Liganden-Rezeptor-Interaktion [144, 145]. Diese Bindung des RAP an die Liganden-Bindungsstelle des Rezeptors kann *in vitro* in Zellkulturexperimenten auch durch extrazelluläre Inkubation mit RAP erfolgen, da jetzt der Rezeptor auf der Zelloberfläche sezerniert ist. Damit ist jede Bindung des eigentlichen Bindungspartners an den entsprechenden Rezeptor inhibiert. Somit war auch die Bindung des ApoEs der spezifischen Nanopartikel an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche gehemmt. Mit diesem Experiment konnte die spezifische Nanopartikel-Bindung auf zellulärer Seite gezielt inhibiert werden. In Koinkubationsexperimenten nur mit Nanopartikeln und RAP, ohne LDL (Daten nicht gezeigt), konnten diese Ergebnisse tendenziell bestätigt werden, allerdings war der hemmende Einfluss von RAP nicht ganz so hoch. Dies genauso wie der scheinbar minimale Einfluss des herstellungsbedingten GST-Tags von RAP, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Jedoch wiesen all diese Ergebnisse eindeutig auf eine Beteiligung der LDL-Rezeptor-Familie hin.

Da die Konzentration hauptsächlich bei LRP als möglichen Rezeptor lag, wurde versucht die Bindungsdomäne des LRP herauszufinden, die an der spezifischen ApoE-vermittelten Bindung der Nanopartikel an die Zellen beteiligt war. Hierzu wurden die Nanopartikel zusammen mit löslichen Fragmenten des LRP inkubiert. Diese Fragmente repräsentierten genau die Haupt-Bindungsdomäne II bzw. IV des LRP [206]. Mit beiden Fragmenten kam es zu einer Hemmung der spezifischen Partikel-Bindung, wobei die Inkubation mit LRP Dom IV stärkere Effekte zeigte, aber

grundsätzlich eine Bindung über beide Domänen möglich war. Dies wurde schon öfter für Liganden des LRP beobachtet [206]. Mit diesem Versuch war eine Inhibition der spezifischen zellulären Nanopartikel-Bindung auf nanopartikulärer Seite gezeigt, da die LRP-Fragmente das partikulär-gebundene ApoE für eine weitere spezifische Bindung mit dem Rezeptor auf der Zelloberfläche blockierten. Auch bei diesem Experiment war eine leichte Erhöhung des unspezifischen Bindungs-Anteils zu erkennen. Es scheint generell so, dass die Zellen die unspezifische Nanopartikel-Aufnahme erhöhten, wenn der spezifische Aufnahme-Weg inhibiert wurde. Ob dies tatsächlich der Fall ist und was der Grund dafür ist, muss noch geklärt werden.

Mit diesen Experimenten wurde eindeutig die Beteiligung der LDL-Rezeptor-Familie und besonders des LRP, bei der spezifischen ApoE-vermittelten Nanopartikel-Aufnahme gezeigt.

Die ersten Hinweise, dass Apolipoproteine an dem spezifischen Rezeptor-vermittelten Transport der Nanopartikel über die BHS beteiligt sein könnten, erhielt man durch Versuche mit Polysorbat 80-gecoateten PBCA-Nanopartikeln. Man vermutete, dass diese Partikel nach Injektion in die Blutbahn Apolipoproteine auf ihre Oberfläche adsorbierten und damit zirkulierenden Lipoproteinen glichen [133, 135, 136]. Diese Apolipoprotein-modifizierten Nanopartikel könnten mit den Apolipoprotein-Rezeptoren der BHS interagieren und eventuell über Transzytose in das Gehirn gelangen. Diese Vermutung wurde unterstützt durch Versuche mit Nanopartikeln, die Apolipoprotein E, Apolipoprotein AI oder Apolipoprotein B100 entweder adsorbiert oder kovalent gebunden trugen und angehaftete Wirkstoffe gut über die Blut-Hirn-Schranke transportierten [126, 130]. Auch für die Polysorbat 80-gecoateten PBCA-Nanopartikel konnte kürzlich die selektive neuronale Aufnahme *in vitro* in Primärzellen gezeigt werden, die durch einen LDLR-Antikörper gehemmt werden konnte [207]. Dieses Ergebnis sprach ebenfalls für einen LDL-Rezeptor vermittelten Aufnahmeweg.

Es hat sich gezeigt, dass nicht vollständige Apolipoproteine für eine spezifische Aufnahme an Partikel oder Liposomen gebunden sein müssen, sondern dass Peptide, die nur die Bindungssequenzen für eine Rezeptorbindung enthalten, ausreichend sind [208-211].

In Zusammenhang mit der spezifischen nanopartikulären ApoE-vermittelten Überwindung der BHS werden aber nicht nur die LDL-Rezeptoren diskutiert, sondern auch die Beteiligung von Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) [208, 210] oder Scavenger-Rezeptoren [126, 130] als alternative Aufnahmemechanismen.

Ebenso konnten für ein spezifisches Targeting Liganden anderer Rezeptoren, wie z.B. Transferrin oder Transferrin-Rezeptor-Antikörper, an die Oberfläche von Nanopartikeln gekoppelt werden [125] und mit diesen Nanopartikeln ein Überwinden der Blut-Hirn-Schranke erreicht werden.

Wirkstofftransport-Studien

Aus der Gesamtheit all dieser Versuche war zu schließen, dass ApoE-modifizierte Nanopartikel fähig sind, spezifisch Wirkstoffe über die Blut-Hirn-Schranke zu transportieren. Sie stellen daher für die Zukunft einen sehr viel versprechenden Ansatz im Kampf gegen Hirntumore, Alzheimer und andere neurodegenerative Erkrankungen, aber auch für die Behandlung von Organophosphat-Vergiftungen dar. In den folgenden Versuchen sollte überprüft werden, ob nanopartikuläre Formulierungen tatsächlich einen verbesserten Transport von Oximen, den Antidot nach Organophosphat-Vergiftungen, in einem *in vitro* BHS-Modell zeigten. Der beträchtliche Gebrauch von Organophosphaten (OP) in der Landwirtschaft als Insektizide und Pestizide und der Missbrauch für Selbstmord-Versuche verursacht jährlich mehrere hunderttausend Vergiftungen und Todesopfer [147-151]. Auch oder besonders der anhaltende Gebrauch während militärischer Konflikte und durch Terroristen [157] verdeutlicht die Notwendigkeit, eine effektive medizinische Behandlung nach OP-Vergiftungen zu entwickeln. Die akute Toxizität nach OP-Vergiftungen ist hauptsächlich verursacht durch die Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE) im peripheren und zentralen Nervensystem [158-161]. Dies führt zu einer Erhöhung der synaptischen AChE-Konzentration und infolge dessen zu einer Akkumulation von Acetylcholin im synaptischen Spalt, Überstimulation des cholinergen Rezeptors und Fehlsteuerung vieler Körperfunktionen, die bis hin zum Tod führen können [158]. Oxime als Reaktivatoren der AChE können jedoch die BHS nicht in therapeutisch relevantem Maß passieren [167-171]. Daher sollten diese Antidote, beispielhaft Obidoxim, in HSA-Nanopartikel inkorporiert und deren Fähigkeit, diese Oxime über die BHS zu transportieren, in präklinischen Versuchen verifiziert werden.

Die Obidoxim-beladenen HSA-Nanopartikel konnten nach einem standardisierten Verfahren hergestellt werden. Die physikochemische Charakterisierung bestätigte deren monodispere Partikel-Verteilung. Daher konnten diese Partikel als Drug-Carrier eingesetzt und deren Eignung zum BHS-Targeting *in vitro* überprüft werden. Um die sehr zeitaufwendige und kostenintensive Isolation primärer Gehirnkapillarendothel-Zellen zu minimieren, wurden für Bindungs-, Aufnahme- und zelluläre Verteilungsstudien Gehirnkapillarendothel-Zelllinien, wie bEnd3, eingesetzt, die zwar die entsprechenden Rezeptoren der BHS noch exprimieren, aber schon einige andere Eigenschaften der BHS, wie einen hohen transendothelialen elektrischen Widerstand als Zeichen für intakte „Tight Junctions“, verloren haben [212, 213]. Auch länger in Kultur gehaltene Primärzellen verlieren mit der Zeit ihre BHS-Eigenschaften [214]. Daher wurden Wirkstofftransport- und Freisetzungs-Studien an frisch präparierten Primärzellen nach Messung ihres transendothelialen elektrischen Widerstands durchgeführt.

Zunächst wurde die zelluläre Bindung dieser nanopartikulären Formulierungen an Endothelzellen bestätigt. Dabei zeigten die ApoE-modifizierten Nanopartikel gegenüber den PEGylierten Kontroll-Partikeln, wie zu erwarten war, eine hohe spezifische zelluläre Bindung. Jedoch war die höchste zelluläre Bindung mit den unmodifizierten Nanopartikeln zu verzeichnen. Die hohe zelluläre Bindung von unmodifizierten Nanopartikeln war aus verschiedenen anderen Versuchen bekannt und als unspezifisch einzustufen.

Mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie wurde die intrazelluläre Aufnahme der spezifischen Nanopartikel gezeigt. Es bestätigten sich die Bindungstendenzen der Nanopartikel wie sie in der durchflusszytometrischen Analyse festgestellt wurden. Die unmodifizierten Nanopartikel wurden am besten in die Zellen aufgenommen.

Zusammenfassend verdeutlichten die Durchflusszytometrie- und CLSM-Daten die Bindung und intrazelluläre Aufnahme der Nanopartikel in Endothelzellen, den Zellen, die hauptsächlich die BHS ausbilden. Nun sollte der tatsächliche nanopartikuläre Wirkstofftransport über ein *in vitro* BHS-Modell mit Primärzellen demonstriert werden. Zunächst musste jedoch abgeklärt werden, dass die Nanopartikel unter den Kulturbedingungen und in den eingesetzten Konzentrationen der Transport- und Freisetzungs-Studien keinen zytotoxischen Effekt auf die Zellen ausübten. Daher wurden der freie Wirkstoff Obidoxim und die zusätzlich adsorptiv beladenen Nanopartikel im Zellviabilitäts-Assay getestet. Für die Oberflächen-modifizierten Nanopartikel und

den freien Wirkstoff konnte mit einer Zellviabilität von ungefähr 100 % nach Inkubation eindeutig jeglicher Effekt auf die Zellen ausgeschlossen werden. Die erhöhte Formazan-Bildung über den Kontroll-Wert nach Inkubation mit den unmodifizierten Nanopartikeln könnte eventuell durch die hohe unspezifische Bindung der Nanopartikel, wie in den Durchflusszytometrie- und CLSM-Daten gesehen, verursacht sein. Dadurch könnte es sein, dass speziell diese unmodifizierten Nanopartikel die Zellen besonders zur Proliferation mit einer einhergehenden erhöhten Mitochondrien-Aktivität anregten. Dieses Phänomen muss aber noch genauer untersucht werden. Aus der Tatsache, dass sowohl freies Obidoxim als auch die adsorptiv-modifizierten inkorporativ-beladenen Nanopartikel keinen zytotoxischen Effekt ausübten, wurde geschlossen, dass auch die nur inkorporativ-modifizierten Nanopartikel keinen zytotoxischen Effekt auf die Primärzellen ausübten, zumal ähnliche Versuche an der Zelllinie (Daten nicht gezeigt) ebenfalls keine Hinweise darauf gaben. Daher wurde auf weitere Versuche verzichtet.

Als adäquates *in vitro* BHS-Modell wurden die Primärzellen im Transwell-System kultiviert und für Transport- und Freisetzungs-Studien eingesetzt. Um eine intakte Schrankenfunktion dieses Modells sicherzustellen, wurde der transendotheliale elektrische Widerstand (TER) über Impedanzmessungen im CellZscope bestimmt. Mit diesem Gerät war eine vollautomatische, stündliche Messung des TER möglich, so dass der ideale Zeitpunkt für eine Partikel-Inkubation abgepasst werden konnte. Auch der Einfluss der Nanopartikel auf das BHS-Modell während der Partikel-Inkubation ist damit zu erfassen, wurde aber noch nicht genauer untersucht. Aus anderen Versuchen ist bekannt, dass manche Nanopartikel keinen Einfluss auf die BHS haben, andere kurzfristig, reversibel den TER absenken (Daten nicht gezeigt).

In den Transport- und Freisetzungs-Studien konnte gezeigt werden, dass generell ein nanopartikulär vermittelter Obidoxim-Transport über die *in vitro* BHS möglich ist. Aber nur die zusätzlich adsorptiv-modifizierten Nanopartikel transportierten eine nachweisbare Obidoxim-Menge. Hier waren besonders die adsorptiv-modifizierten unspezifischen Nanopartikel und die adsorptiv-modifizierten spezifischen Nanopartikel effektiv und zeigten eine bessere Reaktivierung der OP-gehemmten Acetylcholinesterase als freies Obidoxim. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die inkorporative Beladung der Nanopartikel mit Obidoxim für eine effektive, messbare Reaktivierung nicht notwendig ist, sondern dass eine adsorptive Beladung ausreichend oder sogar besser ist. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Frei-

setzung des inkorporierten Wirkstoffs nicht in relevanter Menge stattgefunden hat, aber dass die Nanopartikel den Transport von Obidoxim über die BHS vermitteln und so zu sagen das adsorptiv gebundene Obidoxim über die BHS „schleppten“.

Mit diesen Experimenten konnte die zelluläre Bindung und Aufnahme sowohl der unspezifischen als auch der spezifischen Obidoxim-modifizierten Nanopartikel in Endothelzellen gezeigt werden. Ein nanopartikulär vermittelter Transport dieses Wirkstoffes über ein *in vitro* BHS-Modell war mit diesen nanopartikulären Formulierungen möglich. Daher könnten diese Partikel zukünftig für den Wirkstofftransport über die BHS Erfolg versprechend sein. Das in dieser Arbeit eingesetzte *in vitro* BHS-Modell bestand aus einer Monokultur von primären Gehirnkapillarendothelzellen, die die BHS hauptsächlich ausbilden. Es gibt jedoch Hinweise aus der Arbeit von Zensi et al. [203], dass nur die ApoE-modifizierten Nanopartikel *in vivo* die BHS überwinden konnten und in verschiedenen Hirnregionen wieder zu finden waren. Die PEGylierten Nanopartikel dagegen blieben in den Endothelzellen stecken und konnten die BHS nicht passieren. Des Weiteren zeigten Michaelis et al. [137] in *in vivo* Experimenten, dass Loperamid als freier Wirkstoff nicht die BHS überwinden konnte, dagegen ApoE-modifizierte Nanopartikel signifikant mehr Loperamid über die BHS transportierten als unmodifizierte Nanopartikel. Daher bleibt in weiteren Experimenten zu klären, ob nur die ApoE-modifizierte nanopartikuläre Formulierung tatsächlich als Carrier von Oximen einzusetzen ist. Mit diesen Formulierungen existiert jedoch zum ersten Mal ein Werkzeug („Tool“) zum Transport von Oximen über die BHS, was überlebenswichtig nach Organophosphat-Vergiftungen ist. Daher sind diese nanopartikulären Formulierungen Erfolg versprechende Arzneistoffsysteme zur Behandlung von Organophosphat-Vergiftungen, sowohl im ZNS als auch im gesamten restlichen Körperbereich.

Aus der Summe dieser präklinischen Experimente konnte eindeutig gezeigt werden, dass HSA-basierte nanopartikuläre Arzneistoffsysteme für einen gezielten Wirkstofftransport sowohl im Bereich des spezifischen Tumor-Targetings als auch zur Überwindung biologischer Barrieren geeignet sind. Sie stellen daher einen viel versprechenden Ansatz bei der Entwicklung spezifischer, zielgerichteter Medikamente dar.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Nanopartikuläre Arzneistoffsysteme sind ein viel versprechender Ansatz die speziellen Anforderungen an eine Arzneiform wie Schutz des Wirkstoffs, Verbesserung seiner Bioverfügbarkeit und besonders das spezifische „Drug-Targeting“ und das „Controlled Release“ des Wirkstoffs, umzusetzen. Mit ihnen scheint das lang verfolgte Ziel der Pharmaforschung, das gezielte Transportieren und Freisetzen des Arzneistoffs am Wirkort und damit das Minimieren unerwünschter Nebenwirkungen, in greifbare Nähe zu rücken.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch verschiedene Versuchsansätze in der präklinischen Testung *in vitro* der gezielte Wirkstofftransport zielgerichtet-modifizierter Nanopartikel auf humanem Serumalbumin-Basis sowohl für das spezifische Tumor-Targeting als auch für die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke gezeigt werden.

Die nanopartikulären Formulierungen für das spezifische Tumor-Targeting mit dem Ziel der spezifischen Chemotherapie waren dementsprechend mit dem Zytostatikum Doxorubicin beladen und mit dem tumorspezifischen Liganden Trastuzumab für ein Mammakarzinom-Zellen-Targeting oder DI17E6 für ein Melanom-Zellen-Targeting, modifiziert.

Ihre zielgerichtete Funktionalität konnte *in vitro* an verschiedenen Target-exprimierenden- und Kontroll-Zelllinien gezeigt werden. Die spezifische zelluläre Bindung wurde dabei anhand der grünen Autofluoreszenz der Nanopartikel und der roten Autofluoreszenz des Wirkstoffs Doxorubicin mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Diese Fluoreszenz-Eigenschaften konnten auch für Untersuchungen zur zellulären Aufnahme und subzellulären Verteilung mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie herangezogen werden. Die Ligand-modifizierten Nanopartikel wurden bei diesen Untersuchungen spezifisch in die Zielzellen aufgenommen, die unmodifizierten Kontroll-Partikel klebten dagegen unspezifisch an der Zellmembran. Für den Nachweis des intrazellulären Transports des Wirkstoffes und dessen Prozessierung konnte gezeigt werden, dass die Durchflusszytometrie neben der konfokalen Raster-Lasermikroskopie eine geeignete Methode war. Dagegen stellte sich heraus, dass die Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse für solche Untersuchungen nicht sinnvoll einzusetzen war. Die Freisetzung des Doxorubicins in einer biologisch

aktiven Form konnte anhand entsprechender Zellviabilitäts-Assays gezeigt werden. Dabei erwies sich das spezifische Targeting der Rezeptor-exprimierenden Zielzellen als signifikant. Anhand der gleichen Zellviabilitäts-Assays an Kontroll-Zelllinien ohne oder nur mit schwacher Expression des Zielrezeptors konnte die Spezifität der zielgerichtet-modifizierten Nanopartikel untermauert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der nanopartikulär transportierte Wirkstoff über den Rezeptor-internalisierenden Aufnahmeweg nicht in den Endosomen oder Lysosomen akkumulierte und damit inaktiv war, sondern dass er in wirksamer Form freigesetzt wurde.

Als Besonderheit wurde mit DI17E6 für das spezifische Melanom-Zellen-Targeting ein Antikörper als ziel-orientierter Ligand eingesetzt, der zusätzliche anti-tumorale Eigenschaften hat, die bei der Ankopplung an die Nanopartikel-Oberfläche erhalten werden sollten. Durch speziell entwickelte *in vitro* Assays, die auf diese Eigenschaften abzielten, konnte der Erhalt der biologischen Wirksamkeit des Antikörpers bestätigt werden. Mit DI17E6 und seinen bispezifischen Eigenschaften, zum einen das Tumor-Wachstum zu hemmen und auf der anderen Seite die Angiogenese zu blockieren, ist somit ein Erfolg versprechender monoklonaler Antikörper für die Krebstherapie gefunden worden. Daher sollte nicht nur der freie Antikörper DI17E6, sondern auch die DI17E6-modifizierten Nanopartikel als doppelschneidige Waffe im Kampf gegen Krebs eingesetzt werden können.

Mit derartigen nanopartikulären Formulierungen, basierend auf biologisch abbaubarem humanem Serumalbumin und modifiziert mit entsprechenden zielgerichteten Liganden und anti-tumoralen Wirkstoffen, sollte aufgrund der hier gezeigten prä-klinischen *in vitro* Daten eine spezifische Tumorthherapie möglich sein. Dies muss nun durch einsprechende *in vivo* Studien am Tier bestätigt werden, bevor eine klinische Testung solcher Systeme möglich ist. In der Zukunft werden solche nanopartikulären Drug-Carrier einen bedeutenden und ständig steigenden Anteil in der Krebstherapie einnehmen, um den Wirkstofftransport an den Tumor zu verbessern und gleichzeitig die unerwünschte Beeinflussung des Nachbargewebes und das Auftreten von Nebenwirkungen zu verringern.

Für das Blut-Hirn-Schranken-Targeting wurden Drug-Carrier synthetisiert und getestet, die mit Apolipoprotein E (ApoE) modifiziert waren. Dabei handelte es sich bei den Nanopartikeln für die reinen Aufnahmemechanismus-Studien um leere

Nanopartikel und für die Transportstudien um Obidoxim-beladene Nanopartikel. Bei Obidoxim handelt es sich um einen Vertreter der Stoffklasse der Oxime. Diese werden als Antidote bei teilweise lebensbedrohlichen Organophosphat-Vergiftungen eingesetzt. Oxime können die nach einer Organophosphat-Vergiftung inhibierte lebensnotwendige Acetylcholinesterase reaktivieren. Aber Oxime können die Blut-Hirn-Schranke kaum überwinden und erreichen daher in therapeutisch ausreichendem Maß nur die in der Peripherie und nicht die in den zentralnervösen Kompartimenten inhibierte Acetylcholinesterase. Daher sollte beispielhaft Obidoxim nanopartikulär-vermittelt über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden.

Für beide Formulierungen konnte die spezifische zelluläre Bindung, Aufnahme und die subzelluläre Verteilung gezeigt werden sowie ihre für ein Blut-Hirn-Schranken-Targeting kompatiblen, untoxischen Eigenschaften. Dabei kamen, wie beim Tumor-Targeting, die Durchflusszytometrie, die konfokale Raster-Lasermikroskopie und entsprechend angepasste Zellviabilitäts-Assays zum Einsatz. Als weitere Methode, um die intrazelluläre Verteilung der Nanopartikel zu dokumentieren, wurde hier die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie eingesetzt.

Mit den ApoE-modifizierten unbeladenen Nanopartikeln konnte eindeutig durch verschiedene Koinkubations- und Hemmexperimente die Beteiligung der „Low Density Lipoprotein“ (LDL)-Rezeptor-Familie, und besonders des „Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein“ (LRP), bei der spezifischen ApoE-vermittelten Nanopartikel-Aufnahme gezeigt werden. Dabei ließ sich die Nanopartikel-Aufnahme auf zwei Wegen hemmen. Zum einen von der zellulären Seite aus, durch Hemmung des beteiligten Aufnahme-Rezeptors mit dem „Receptor Associated Protein“ (RAP). RAP ist ein Protein, das unspezifisch die meisten Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Familie, wie dem LRP, blockiert und damit eine spezifische ApoE-vermittelte Nanopartikel-Aufnahme über eine Rezeptor-Bindung verhindert hat. Zum anderen konnte aber auch durch lösliche Fragmente des LRP die ApoE-vermittelte Nanopartikel-Aufnahme auf nanopartikulärer Seite gehemmt werden, da diese Fragmente mit dem ApoE auf der Nanopartikel-Oberfläche interagierten und somit das ApoE nicht mehr für eine Bindung an einen zellulären Rezeptor zur Verfügung stand.

Durch die Kenntnis des Aufnahmemechanismus der nanopartikulären Formulierungen sollte es für zukünftige Entwicklungen im breiten Feld der Blut-Hirn-

Schranken-Forschung möglich sein, sehr spezifische und effektivere Carrier maßzuschneidern.

Zu Untersuchungen des Wirkstofftransports wurden frisch isolierte porcine Gehirnkapillarendothel-Zellen im Transwell-System als adäquates *in vitro* BHS-Modell etabliert und eingesetzt, deren intakte Blut-Hirn-Schranken-Funktion durch Messungen des transendothelialen Widerstands vor jedem Versuch überprüft wurde. Für den Nachweis des tatsächlichen Obidoxim-Transports wurde ein biologischer Assay entwickelt, der gemäß der therapeutischen Funktion von Oximen nach Organophosphat-Vergiftungen auf die Reaktivierung Organophosphat-vergifteter Acetylcholinesterase abzielte. Es konnte gezeigt werden, dass nanopartikuläre Formulierungen tatsächlich einen verbesserten Transport von Obidoximen gegenüber freiem Obidoxim in einem *in vitro* BHS-Modell vermitteln. Dabei waren Partikel mit einer Inkorporation des Wirkstoffs in die Partikelmatrix in diesem Fall nicht so effektiv wie Partikel mit oberflächlicher, adsorptiver Beladung.

Diese nanopartikulären Transportsysteme stellen daher ein bisher einzigartiges viel versprechendes Hilfsmittel zum Transport von Oximen über die BHS dar, die bei der überlebenswichtigen Behandlung von Organophosphat-Vergiftungen mit Oximen sowohl im zentralen Nervensystem als auch im gesamten, restlichen Körperbereich eingesetzt werden können.

Durch die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen konnte insgesamt gezeigt werden, dass nanopartikuläre Drug-Carrier auf Basis von humanem Serumalbumin für einen zielgerichteten Wirkstofftransport geeignet sind und aufgrund ihrer biokompatiblen, bioabbaubaren Eigenschaften einen viel versprechenden Ansatz für die zukünftige Pharmaforschung darstellen.

7. Literatur

- [1] Ehrlich, P.: *Chemotherapie*, in *The Collected Papers of Paul Ehrlich*, Himmelweit, F., Editor. 1960, Pergamon Press: London. 443-455.
- [2] Kreuter, J.: *Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. III: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use*. Pharm Acta Helv 1983, 58(9-10), 242-250.
- [3] Kreuter, J.: *Liposomes and nanoparticles as vehicles for antibiotics*. Infection 1991, 19 Suppl 4, 224-228.
- [4] Kreuter, J.: *Drug targeting with nanoparticles*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 1994, 19(3), 253-256.
- [5] Langer, K.: *Peptide Nanoparticles*, in *Biological and Pharmaceutical Nanomaterials*, Kumar, C. S. S. R., Editor. 2006, Wiley-VCH: Weinheim.
- [6] Birrenbach, G. und Speiser, P. P.: *Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology*. J Pharm Sci 1976, 65(12), 1763-1766.
- [7] Couvreur, P., Tulkens, P., Roland, M., Trouet, A., Speiser, P.: *Nanocapsules: a new type of lysosomotropic carrier*. FEBS Lett 1977, 84(2), 323-326.
- [8] McLeod, A. D., Lam, F. C., Gupta, P. K., Hung, C. T.: *Optimized synthesis of polygluteraldehyde nanoparticles using central composite design*. J Pharm Sci 1988, 77(8), 704-710.
- [9] Kreuter, J. und Speiser, P. P.: *New adjuvants on a polymethylmethacrylate base*. Infect Immun 1976, 13(1), 204-210.
- [10] Kreuter, J. und Speiser, P. P.: *In vitro studies of poly(methyl methacrylate) adjuvants*. J Pharm Sci 1976, 65(11), 1624-1627.
- [11] Kreuter, J.: *Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. I: preparation methods*. Pharm Acta Helv 1983, 58, 196-209.
- [12] Scheffel, U., Rhodes, B. A., Natarajan, T. K., Wagner, H. N., Jr.: *Albumin microspheres for study of the reticuloendothelial system*. J Nucl Med 1972, 13(7), 498-503.
- [13] Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Bauduin, P., Speiser, P.: *Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties*. J Pharm Pharmacol 1979, 31(5), 331-332.
- [14] Gurny, R.: *Preliminary study of prolonged acting drug delivery system for the treatment of glaucoma*. Pharm Acta Helv 1981, 56(4-5), 130-132.
- [15] Kreuter, J.: *Nanoparticles--a historical perspective*. Int J Pharm 2007, 331(1), 1-10.
- [16] Akasaka, Y., Ueda, H., Takayama, K., Machida, Y., Nagai, T.: *Preparation and evaluation of bovine serum albumin nanospheres coated with monoclonal antibodies*. Drug Des Deliv 1988, 3(1), 85-97.
- [17] Damascelli, B., Cantu, G., Mattavelli, F., Tamplenizza, P., Bidoli, P., Leo, E., Dosio, F., Cerrotta, A. M., Di Tolla, G., Frigerio, L. F., Garbagnati, F., Lanocita, R., Marchiano, A., Patelli, G., Spreafico, C., Ticha, V., Vespro, V., Zunino, F.: *Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007): Phase II study of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck and anal canal: preliminary evidence of clinical activity*. Cancer 2001, 92(10), 2592-2602.
- [18] Stolnik, S., Lillum, L., Davis, S. S.: *Long circulating microparticulate drug carriers*. Adv Drug Deliv Rev 1995, 16, 195-241.
- [19] Moghimi, S. M., Hunter, A. C., Murray, J. C.: *Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice*. Pharmacol Rev 2001, 53(2), 283-318.
- [20] Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P.: *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*. Adv Drug Deliv Rev 2002, 54(5), 631-651.
- [21] Brannon-Peppas, L. und Blanchette, J. O.: *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. Adv Drug Deliv Rev 2004, 56(11), 1649-1659.
- [22] van Vlerken, L. E., Vyas, T. K., Amiji, M. M.: *Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery*. Pharm Res 2007, 24(8), 1405-1414.
- [23] Lin, W., Coombes, A. G., Garnett, M. C., Davies, M. C., Schacht, E., Davis, S. S., Illum, L.: *Preparation of sterically stabilized human serum albumin nanospheres using a novel Dextranox-MPEG crosslinking agent*. Pharm Res 1994, 11(11), 1588-1592.
- [24] Kaul, G. und Amiji, M.: *Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery*. Pharm Res 2002, 19(7), 1061-1067.
- [25] Illum, L. und Davis, S. S.: *The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (Poloxamer 338)*. FEBS Lett 1984, 167(1), 79-82.

- [26] Illum, L., Davis, S. S., Muller, R. H., Mak, E., West, P.: *The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a block copolymer--poloxamine 908*. Life Sci 1987, 40(4), 367-374.
- [27] Troster, S. D. und Kreuter, J.: *Influence of the surface properties of low contact angle surfactants on the body distribution of ¹⁴C-poly(methyl methacrylate) nanoparticles*. J Microencapsul 1992, 9(1), 19-28.
- [28] Tröster, S. D., Müller, U., Kreuter, J.: *Modification of the body distribution of poly(methylmethacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants*. Int. J. Pharm. 1990, 61, 85-100.
- [29] Borchard, G. und Kreuter, J.: *Interaction of serum components with poly(methylmethacrylate) nanoparticles and the resulting body distribution after intravenous injection in rats*. J Drug Target 1993, 1(1), 15-19.
- [30] Storm, G., Belliot, S. O., Daemen, T., Lasic, D. D.: *Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system*. Adv Drug Deliv Rev 1995, 17, 31-48.
- [31] Torchilin, V. P.: *Multifunctional nanocarriers*. Adv Drug Deliv Rev 2006, 58(14), 1532-1555.
- [32] Moghimi, S. M. und Hunter, A. C.: *Capture of stealth nanoparticles by the body's defences*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 2001, 18(6), 527-550.
- [33] Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M. T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., Langer, R.: *Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres*. Science 1994, 263(5153), 1600-1603.
- [34] Bazile, D., Prud'homme, C., Bassoullet, M. T., Marlard, M., Spenlehauer, G., Veillard, M.: *Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system*. J Pharm Sci 1995, 84(4), 493-498.
- [35] Peracchia, M. T., Fattal, E., Desmaele, D., Besnard, M., Noel, J. P., Gomis, J. M., Appel, M., d'Angelo, J., Couvreur, P.: *Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting*. J Control Release 1999, 60(1), 121-128.
- [36] Calvo, P., Gouritin, B., Chacun, H., Desmaele, D., D'Angelo, J., Noel, J. P., Georgin, D., Fattal, E., Andreux, J. P., Couvreur, P.: *Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery*. Pharm Res 2001, 18(8), 1157-1166.
- [37] Brigger, I., Morizet, J., Aubert, G., Chacun, H., Terrier-Lacombe, M. J., Couvreur, P., Vassal, G.: *Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting*. J Pharmacol Exp Ther 2002, 303(3), 928-936.
- [38] Fundaro, A., Cavalli, R., Bargoni, A., Vighetto, D., Zara, G. P., Gasco, M. R.: *Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats*. Pharmacol Res 2000, 42(4), 337-343.
- [39] Zara, G. P., Cavalli, R., Bargoni, A., Fundaro, A., Vighetto, D., Gasco, M. R.: *Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and other tissues*. J Drug Target 2002, 10(4), 327-335.
- [40] Couvreur, P. und Vauthier, C.: *Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease*. Pharm. Res. 2006, 23(7), 1417-1450.
- [41] Cirstoiu-Hapca, A., Bossy-Nobs, L., Buchegger, F., Gurny, R., Delie, F.: *Differential tumor cell targeting of anti-HER2 (Herceptin) and anti-CD20 (Mabthera) coupled nanoparticles*. Int. J. Pharm. 2007, 331(2), 190-196.
- [42] Langer, K., Anhorn, M. G., Steinhäuser, I., Dreis, S., Celebi, D., Schrickel, N., Faust, S., Vogel, V.: *Human serum albumin (HSA) nanoparticles: reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation*. Int J Pharm 2008, 347(1-2), 109-117.
- [43] Langer, K., Coester, C., Weber, C., von Briesen, H., Kreuter, J.: *Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid*. Eur J Pharm Biopharm 2000, 49(3), 303-307.
- [44] Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., von Briesen, H., Schubert, D.: *Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles*. Int. J. Pharm. 2003, 257(1-2), 169-180.
- [45] Weber, C., Coester, C., Kreuter, J., Langer, K.: *Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles*. Int J Pharm 2000, 194(1), 91-102.
- [46] Weber, C., Kreuter, J., Langer, K.: *Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles*. Int J Pharm 2000, 196(2), 197-200.
- [47] Weber, C., Reiss, S., Langer, K.: *Preparation of surface modified protein nanoparticles by introduction of sulfhydryl groups*. Int J Pharm 2000, 211(1-2), 67-78.
- [48] Wartlick, H., Spankuch-Schmitt, B., Strebhardt, K., Kreuter, J., Langer, K.: *Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles*. J. Control. Release 2004, 96(3), 483-495.

- [49] Vogel, V., Langer, K., Balthasar, S., Schuck, P., Mächtle, W., Haase, W., van den Broek, J. A., Tziatzios, C., Schubert, D.: *Characterization of serum albumin nanoparticles by sedimentation velocity analysis and electron microscopy*, in *Progress in Colloid and Polymer Science*. 2002, Springer: Berlin / Heidelberg. 31-36.
- [50] Rubino, O. P., Kowalsky, R., Swarbrick, J.: *Albumin microspheres as a drug delivery system: relation among turbidity ratio, degree of cross-linking, and drug release*. *Pharm Res* 1993, 10(7), 1059-1065.
- [51] Wartlick, H., Michaelis, K., Balthasar, S., Strebhardt, K., Kreuter, J., Langer, K.: *Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells*. *J. Drug Target*. 2004, 12(7), 461-471.
- [52] Nobs, L., Buchegger, F., Gurny, R., Allemann, E.: *Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles*. *J. Pharm. Sci.* 2004, 93(8), 1980-1992.
- [53] Dinauer, N., Balthasar, S., Weber, C., Kreuter, J., Langer, K., von Briesen, H.: *Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes*. *Biomaterials* 2005, 26(29), 5898-5906.
- [54] Steinhäuser, I., Spänkuch, B., Strebhardt, K., Langer, K.: *Trastuzumab-modified nanoparticles: Optimisation of preparation and uptake in cancer cells*. *Biomaterials* 2006, 27(28), 4975-4983.
- [55] Yokoyama, M. und Okano, T.: *Targetable drug carriers: present status and a future perspective*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1996, 21, 77-80.
- [56] Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K.: *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. *J. Control. Release* 2000, 65(1-2), 271-284.
- [57] Noguchi, Y., Wu, J., Duncan, R., Strohalm, J., Ulbrich, K., Akaike, T., Maeda, H.: *Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues*. *Jpn J Cancer Res* 1998, 89(3), 307-314.
- [58] Kaul, G. und Amiji, M.: *Biodistribution and targeting potential of poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles in subcutaneous murine tumor model*. *J Drug Target* 2004, 12(9-10), 585-591.
- [59] Greenwald, R. B.: *PEG drugs: an overview*. *J. Control. Release* 2001, 74(1-3), 159-171.
- [60] Douglas, S. J., Davis, S. S., Illum, L.: *Nanoparticles in drug delivery*. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1987, 3(3), 233-261.
- [61] Ezpeleta, I., Arango, M. A., Irache, J. M., Stainmesse, S., Chabenat, C., Popineau, Y., Orecchioni, A. M.: *Preparation of Ulex europaeus lectin-gliadin nanoparticle conjugates and their interaction with gastrointestinal mucus*. *Int J Pharm* 1999, 191(1), 25-32.
- [62] Hussain, N., Jani, P. U., Florence, A. T.: *Enhanced oral uptake of tomato lectin-conjugated nanoparticles in the rat*. *Pharm Res* 1997, 14(5), 613-618.
- [63] Irache, J. M., Durrer, C., Duchene, D., Ponchel, G.: *Preparation and characterization of lectin-latex conjugates for specific bioadhesion*. *Biomaterials* 1994, 15(11), 899-904.
- [64] Leserman, L. D., Barbet, J., Kourilsky, F., Weinstein, J. N.: *Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A*. *Nature* 1980, 288(5791), 602-604.
- [65] Takakura, Y. und Hashida, M.: *Macromolecular carrier systems for targeted drug delivery: pharmacokinetic considerations on biodistribution*. *Pharm Res* 1996, 13(6), 820-831.
- [66] Olivier, J. C., Huertas, R., Lee, H. J., Calon, F., Pardridge, W. M.: *Synthesis of pegylated immunonanoparticles*. *Pharm Res* 2002, 19(8), 1137-1143.
- [67] MacAdam, A. B., Shafi, Z. B., Marriott, C., Martin, G. P., James, S. L.: *Anti-mucus polyclonal antibody production, purification and linkage to the surface of albumin microspheres*. *Int J Pharm* 2000, 195(1-2), 147-158.
- [68] Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H. P., Novotny, W.: *Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer*. *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3(5), 391-400.
- [69] Ferrara, N., Hillan, K. J., Novotny, W.: *Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 333(2), 328-335.
- [70] Adams, G. P. und Weiner, L. M.: *Monoclonal antibody therapy of cancer*. *Nat Biotechnol* 2005, 23(9), 1147-1157.
- [71] Pavlou, A. K. und Belsey, M. J.: *The therapeutic antibodies market to 2008*. *Eur J Pharm Biopharm* 2005, 59(3), 389-396.
- [72] Trachsel, E. und Neri, D.: *Antibodies for angiogenesis inhibition, vascular targeting and endothelial cell transcytosis*. *Adv Drug Deliv Rev* 2006, 58(5-6), 735-754.
- [73] Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., Hynes, N. E.: *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. *EMBO J* 2000, 19(13), 3159-3167.

- [74] Baselga, J. und Arteaga, C. L.: *Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer*. J Clin Oncol 2005, 23(11), 2445-2459.
- [75] Yarden, Y.: *The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities*. Eur J Cancer 2001, 37 Suppl 4, 3-8.
- [76] Yarden, Y.: *Biology of HER2 and its importance in breast cancer*. Oncology 2001, 61 Suppl 2, 1-13.
- [77] Harries, M. und Smith, I.: *The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin)*. Endocr Relat Cancer 2002, 9(2), 75-85.
- [78] Valabrega, G., Montemurro, F., Aglietta, M.: *Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer*. Ann. Oncol. 2007, 18(6), 977-984.
- [79] Hynes, N. E. und Stern, D. F.: *The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer*. Biochim Biophys Acta 1994, 1198(2-3), 165-184.
- [80] Toikkanen, S., Helin, H., Isola, J., Joensuu, H.: *Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up*. J Clin Oncol 1992, 10(7), 1044-1048.
- [81] Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., McGuire, W. L.: *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science 1987, 235(4785), 177-182.
- [82] Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., et al.: *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. Science 1989, 244(4905), 707-712.
- [83] Nahta, R. und Esteva, F. J.: *Herceptin: mechanisms of action and resistance*. Cancer Lett 2006, 232(2), 123-138.
- [84] Horton, J.: *Trastuzumab use in breast cancer: clinical issues*. Cancer Control 2002, 9(6), 499-507.
- [85] Morrison, C., Zanagnolo, V., Ramirez, N., Cohn, D. E., Kelbick, N., Copeland, L., Maxwell, G. L., Fowler, J. M.: *HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients*. J Clin Oncol 2006, 24(15), 2376-2385.
- [86] Ferretti, G., Felici, A., Papaldo, P., Fabi, A., Cognetti, F.: *HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend*. Curr Opin Obstet Gynecol 2007, 19(1), 56-62.
- [87] Hayes, D. F. und Picard, M. H.: *Heart of darkness: the downside of trastuzumab*. J Clin Oncol 2006, 24(25), 4056-4058.
- [88] Albelda, S. M., Mente, S. A., Elder, D. E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., Buck, C. A.: *Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression*. Cancer Res 1990, 50(20), 6757-6764.
- [89] Pijuan-Thompson, V. und Gladson, C. L.: *Ligation of integrin alpha5beta1 is required for internalization of vitronectin by integrin alphavbeta3*. J Biol Chem 1997, 272(5), 2736-2743.
- [90] Rabb, H., Barroso-Vicens, E., Adams, R., Pow-Sang, J., Ramirez, G.: *Alpha-V/beta-3 and alpha-V/beta-5 integrin distribution in neoplastic kidney*. Am J Nephrol 1996, 16(5), 402-408.
- [91] Liapis, H., Adler, L. M., Wick, M. R., Rader, J. S.: *Expression of alpha(v)beta3 integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas*. Hum Pathol 1997, 28(4), 443-449.
- [92] Bello, L., Zhang, J., Nikas, D. C., Strasser, J. F., Villani, R. M., Cheresch, D. A., Carroll, R. S., Black, P. M.: *Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in meningiomas*. Neurosurgery 2000, 47(5), 1185-1195.
- [93] Gladson, C. L.: *Expression of integrin alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastoma tumors*. J Neuropathol Exp Neurol 1996, 55(11), 1143-1149.
- [94] Gladson, C. L., Hancock, S., Arnold, M. M., Faye-Petersen, O. M., Castleberry, R. P., Kelly, D. R.: *Stage-specific expression of integrin alphavbeta3 in neuroblastic tumors*. Am J Pathol 1996, 148(5), 1423-1434.
- [95] Patey, M., Delemer, B., Bellon, G., Martiny, L., Pluot, M., Haye, B.: *Immunohistochemical study of thrombospondin and its receptors alpha root of beta 3 and CD36 in normal thyroid and in thyroid tumours*. J Clin Pathol 1999, 52(12), 895-900.
- [96] Ritter, M. R., Dorrell, M. I., Edmonds, J., Friedlander, S. F., Friedlander, M.: *Insulin-like growth factor 2 and potential regulators of hemangioma growth and involution identified by large-scale expression analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A 2002, 99(11), 7455-7460.
- [97] Eliceiri, B. P. und Cheresch, D. A.: *The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development*. J Clin Invest 1999, 103(9), 1227-1230.

- [98] Enestein, J. und Kramer, R. H.: *Confocal microscopic analysis of integrin expression on the microvasculature and its sprouts in the neonatal foreskin*. J Invest Dermatol 1994, 103(3), 381-386.
- [99] Sepp, N. T., Li, L. J., Lee, K. H., Brown, E. J., Caughman, S. W., Lawley, T. J., Swerlick, R. A.: *Basic fibroblast growth factor increases expression of the alpha v beta 3 integrin complex on human microvascular endothelial cells*. J Invest Dermatol 1994, 103(3), 295-299.
- [100] Brooks, P. C., Clark, R. A., Cheresch, D. A.: *Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis*. Science 1994, 264(5158), 569-571.
- [101] Brooks, P. C., Montgomery, A. M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G., Cheresch, D. A.: *Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels*. Cell 1994, 79(7), 1157-1164.
- [102] Mitjans, F., Sander, D., Adan, J., Sutter, A., Martinez, J. M., Jaggle, C. S., Moyano, J. M., Kreysch, H. G., Piulats, J., Goodman, S. L.: *An anti-alpha v-integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice*. J Cell Sci 1995, 108 (Pt 8), 2825-2838.
- [103] Mitjans, F., Meyer, T., Fittschen, C., Goodman, S., Jonczyk, A., Marshall, J. F., Reyes, G., Piulats, J.: *In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alphav integrins*. Int J Cancer 2000, 87(5), 716-723.
- [104] Brooks, P. C., Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F. H., Cheresch, D. A.: *Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin*. J Clin Invest 1995, 96(4), 1815-1822.
- [105] Felding-Habermann, B., Mueller, B. M., Romerdahl, C. A., Cheresch, D. A.: *Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity*. J Clin Invest 1992, 89(6), 2018-2022.
- [106] Hammes, H. P., Brownlee, M., Jonczyk, A., Sutter, A., Preissner, K. T.: *Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization*. Nat Med 1996, 2(5), 529-533.
- [107] Petitclerc, E., Stromblad, S., von Schalscha, T. L., Mitjans, F., Piulats, J., Montgomery, A. M., Cheresch, D. A., Brooks, P. C.: *Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival*. Cancer Res 1999, 59(11), 2724-2730.
- [108] Pardridge, W. M.: *The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development*. NeuroRx 2005, 2(1), 3-14.
- [109] Crone, C. und Olesen, S. P.: *Electrical resistance of brain microvascular endothelium*. Brain Res 1982, 241(1), 49-55.
- [110] Butt, A. M., Jones, H. C., Abbott, N. J.: *Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study*. J Physiol 1990, 429, 47-62.
- [111] Rubin, L. L. und Staddon, J. M.: *The cell biology of the blood-brain barrier*. Annu Rev Neurosci 1999, 22, 11-28.
- [112] Begley, D. J.: *Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities*. Pharmacol Ther 2004, 104(1), 29-45.
- [113] Begley, D. J.: *Understanding and circumventing the blood-brain barrier*. Acta Paediatr Suppl 2003, 92(443), 83-91.
- [114] Pardridge, W. M.: *Drug delivery to the brain*. J Cereb Blood Flow Metab 1997, 17(7), 713-731.
- [115] Neuwelt, E. A. und Barnett, P. A.: in *Implications of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Neuwelt, E. A., Editor. 1989, Springer: New York.
- [116] Pardridge, W. M.: *Recent advances in blood-brain barrier transport*. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1988, 28, 25-39.
- [117] Kreuter, J., Alyautdin, R. N., Kharkevich, D. A., Ivanov, A. A.: *Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles)*. Brain Res 1995, 674(1), 171-174.
- [118] Calvo, P., Gouritin, B., Brigger, I., Lasmezas, C., Deslys, J., Williams, A., Andreux, J. P., Dormont, D., Couvreur, P.: *PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as vector for drug delivery in prion diseases*. J Neurosci Methods 2001, 111(2), 151-155.
- [119] Steiniger, S. C., Kreuter, J., Khalansky, A. S., Skidan, I. N., Bobruskin, A. I., Smirnova, Z. S., Severin, S. E., Uhl, R., Kock, M., Geiger, K. D., Gelperina, S. E.: *Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles*. Int J Cancer 2004, 109(5), 759-767.
- [120] Gulyaev, A. E., Gelperina, S. E., Skidan, I. N., Antropov, A. S., Kivman, G. Y., Kreuter, J.: *Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles*. Pharm Res 1999, 16(10), 1564-1569.
- [121] Hekmatara, T., Bernreuther, C., Khalansky, A. S., Theisen, A., Weissenberger, J., Matschke, J., Gelperina, S., Kreuter, J., Glatzel, M.: *Efficient systemic therapy of rat glioblastoma by*

- nanoparticle-bound doxorubicin is due to antiangiogenic effects.* Clin Neuropathol 2009, 28(3), 153-164.
- [122] Alyautdin, R., Gothier, D., Petrov, V., Kharkevich, D., Kreuter, J.: *Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles.* Eur. J. Pharm. Biopharm. 1995, 41, 44-48.
- [123] Schroeder, U., Sommerfeld, P., Ulrich, S., Sabel, B. A.: *Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier.* J Pharm Sci 1998, 87(11), 1305-1307.
- [124] Alyautdin, R. N., Petrov, V. E., Langer, K., Berthold, A., Kharkevich, D. A., Kreuter, J.: *Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles.* Pharm Res 1997, 14(3), 325-328.
- [125] Ulbrich, K., Hekmatara, T., Herbert, E., Kreuter, J.: *Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB).* Eur J Pharm Biopharm 2009, 71(2), 251-256.
- [126] Kreuter, J., Hekmatara, T., Dreis, S., Vogel, T., Gelperina, S., Langer, K.: *Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain.* J Control Release 2007, 118(1), 54-58.
- [127] Alyautdin, R. N., Tezikov, E. B., Ramge, P., Kharkevich, D. A., Begley, D. J., Kreuter, J.: *Significant entry of tubocurarine into the brain of rats by adsorption to polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles: an in situ brain perfusion study.* J Microencapsul 1998, 15(1), 67-74.
- [128] Friese, A., Seiller, E., Quack, G., Lorenz, B., Kreuter, J.: *Increase of the duration of the anticonvulsive activity of a novel NMDA receptor antagonist using poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles as a parenteral controlled release system.* Eur J Pharm Biopharm 2000, 49(2), 103-109.
- [129] Rhaese, S., von Briesen, H., Rubsamen-Waigmann, H., Kreuter, J., Langer, K.: *Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery.* J Control Release 2003, 92(1-2), 199-208.
- [130] Petri, B., Bootz, A., Khalansky, A., Hekmatara, T., Muller, R., Uhl, R., Kreuter, J., Gelperina, S.: *Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants.* J Control Release 2007, 117(1), 51-58.
- [131] Kreuter, J.: *Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs.* Adv Drug Deliv Rev 2001, 47(1), 65-81.
- [132] Lück, M.: *Plasmaproteinadsorption als möglicher Schlüsselfaktor für eine kontrollierte Arzneistoffapplikation mit partikulären Trägern.* 1997, Freie Universität Berlin: Berlin.
- [133] Kreuter, J., Shamenkov, D., Petrov, V., Ramge, P., Cychutek, K., Koch-Brandt, C., Alyautdin, R.: *Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier.* J Drug Target 2002, 10(4), 317-325.
- [134] Kreuter, J., Ramge, P., Petrov, V., Hamm, S., Gelperina, S. E., Engelhardt, B., Alyautdin, R., von Briesen, H., Begley, D. J.: *Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles.* Pharm Res 2003, 20(3), 409-416.
- [135] Kreuter, J.: *Nanoparticles as drug delivery systems for the brain*, in *Microencapsulation: Methods and Industrial Application*, Benita, S., Editor. 2006, Taylor and Francis: New York. 689-706.
- [136] Kreuter, J.: *Nanoparticulate carriers for drug delivery to the brain*, in *Nanoparticulates as Drug Carrier*, Torchilin, V. P., Editor. 2006, Imperial College Press: London. 527-547.
- [137] Michaelis, K., Hoffmann, M. M., Dreis, S., Herbert, E., Alyautdin, R. N., Michaelis, M., Kreuter, J., Langer, K.: *Covalent linkage of apolipoprotein e to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain.* J Pharmacol Exp Ther 2006, 317(3), 1246-1253.
- [138] Weisgraber, K. H.: *Apolipoprotein E: structure-function relationships.* Adv Protein Chem 1994, 45, 249-302.
- [139] Weisgraber, K. H.: *Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112.* J Lipid Res 1990, 31(8), 1503-1511.
- [140] Peters-Libeu, C. A., Newhouse, Y., Hatters, D. M., Weisgraber, K. H.: *Model of biologically active apolipoprotein E bound to dipalmitoylphosphatidylcholine.* J Biol Chem 2006, 281(2), 1073-1079.
- [141] Weisgraber, K. H. und Mahley, R. W.: *Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection.* FASEB J 1996, 10(13), 1485-1494.
- [142] Mahley, R. W.: *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology.* Science 1988, 240(4852), 622-630.

-
- [143] Hertz, J. und Marchang, P.: *Coaxing the LDL receptor family into the fold*. Cell 2003, 112, 289-292.
 - [144] Bu, G., Geuze, H. J., Strous, G. J., Schwartz, A. L.: *39 kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptor-related protein*. EMBO J 1995, 14(10), 2269-2280.
 - [145] Bu, G. und Rennke, S.: *Receptor-associated protein is a folding chaperone for low density lipoprotein receptor-related protein*. J Biol Chem 1996, 271(36), 22218-22224.
 - [146] Willnow, T. E., Rohlmann, A., Horton, J., Otani, H., Braun, J. R., Hammer, R. E., Herz, J.: *RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors*. EMBO J 1996, 15(11), 2632-2639.
 - [147] Gunnell, D. und Eddleston, M.: *Suicide by intentional ingestion of pesticides: a continuing tragedy in developing countries*. Int J Epidemiol 2003, 32(6), 902-909.
 - [148] Kwong, T. C.: *Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology*. Ther Drug Monit 2002, 24(1), 144-149.
 - [149] Forget, G.: *Pesticides and the Third World*. J Toxicol Environ Health 1991, 32(1), 11-31.
 - [150] Jeyaratnam, J.: *Acute pesticide poisoning: a major global health problem*. World Health Stat Q 1990, 43(3), 139-144.
 - [151] Eddleston, M., Karalliedde, L., Buckley, N., Fernando, R., Hutchinson, G., Isbister, G., Konradsen, F., Murray, D., Piola, J. C., Senanayake, N., Sheriff, R., Singh, S., Siwach, S. B., Smit, L.: *Pesticide poisoning in the developing world--a minimum pesticides list*. Lancet 2002, 360(9340), 1163-1167.
 - [152] Amr, M. M.: *Pesticide monitoring and its health problems in Egypt, a Third World country*. Toxicol Lett 1999, 107(1-3), 1-13.
 - [153] Brown, S. K., Ames, R. G., Mengle, D. C.: *Occupational illnesses from cholinesterase-inhibiting pesticides among agricultural applicators in California, 1982-1985*. Arch Environ Health 1989, 44(1), 34-39.
 - [154] Cocker, J., Mason, H. J., Garfitt, S. J., Jones, K.: *Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides*. Toxicol Lett 2002, 134(1-3), 97-103.
 - [155] Eddleston, M., Szinicz, L., Eyer, P., Buckley, N.: *Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials*. QJM 2002, 95(5), 275-283.
 - [156] Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, F., Worek, F., Eyer, P., Felgenhauer, N., Zilker, T.: *Modern strategies in therapy of organophosphate poisoning*. Toxicol Lett 1999, 107(1-3), 233-239.
 - [157] Nagao, M., Takatori, T., Matsuda, Y., Nakajima, M., Iwase, H., Iwadate, K.: *Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo subway*. Toxicol Appl Pharmacol 1997, 144(1), 198-203.
 - [158] Marrs, T. C., Maynard, R. L., Sidell, F. R.: *Chemical warfare agents toxicology and treatment*. 2007, Chichester: John Wiley & Sons.
 - [159] Taylor, P., Radic, Z., Hosea, N. A., Camp, S., Marchot, P., Berman, H. A.: *Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition*. Toxicol Lett 1995, 82-83, 453-458.
 - [160] MacPhee-Quigley, K., Taylor, P., Taylor, S.: *Primary structures of the catalytic subunits from two molecular forms of acetylcholinesterase. A comparison of NH2-terminal and active center sequences*. J Biol Chem 1985, 260(22), 12185-12189.
 - [161] Holmstedt, B.: *Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors*. Pharmacol Rev 1959, 11, 567-688.
 - [162] Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F. M.: *Molecular and cellular biology of cholinesterases*. Prog Neurobiol 1993, 41(1), 31-91.
 - [163] Paudyal, B. P.: *Organophosphorus poisoning*. JNMA J Nepal Med Assoc 2008, 47(172), 251-258.
 - [164] Eyer, P.: *The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning*. Toxicol Rev 2003, 22(3), 165-190.
 - [165] Eyer, P., Szinicz, L., Thiermann, H., Worek, F., Zilker, T.: *Testing of antidotes for organophosphorus compounds: experimental procedures and clinical reality*. Toxicology 2007, 233(1-3), 108-119.
 - [166] Eyer, P. A. und Worek, F.: *Oximes*, in *Chemical Warfare Agents*, Marrs, T. C., Maynard, R. L., Sidell, F. R., Editors. 2007, John Wiley & Sons: Chichester.
 - [167] Hobbiger, F. und Vojvodic, V.: *The reactivation by pyridium aldoximes of phosphorylated acetylcholinesterase in the central nervous system*. Biochem Pharmacol 1967, 16(3), 455-462.
 - [168] Firemark, H., Barlow, C. F., Roth, L. J.: *The Penetration of 2-Pam-C14 into Brain and the Effect of Cholinesterase Inhibitors on Its Transport*. J Pharmacol Exp Ther 1964, 145, 252-265.
 - [169] Ligtenstein, D. A. und Kossen, S. P.: *Kinetic profile in blood and brain of the cholinesterase reactivating oxime HI-6 after intravenous administration to the rat*. Toxicol Appl Pharmacol 1983, 71(2), 177-183.

- [170] Ligtenstein, D. A., Moes, G. W., Kossen, S. P.: *In vivo distribution of organophosphate antidotes: autoradiography of [¹⁴C]HI-6 in the rat*. Toxicol Appl Pharmacol 1988, 92(2), 324-329.
- [171] Lundy, P. M., Hand, B. T., Broxup, B. R., Yipchuck, G., Hamilton, M. G.: *Distribution of the bispyridinium oxime [¹⁴C] HI-6 in male and female rats*. Arch Toxicol 1990, 64(5), 377-382.
- [172] Lundy, P. M. und Shih, T. M.: *Examination of the role of central cholinergic mechanisms in the therapeutic effects of HI-6 in organophosphate poisoning*. J Neurochem 1983, 40(5), 1321-1328.
- [173] Dreis, S., Rothweiler, F., Michaelis, M., Cinatl, J., Jr., Kreuter, J., Langer, K.: *Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles*. Int. J. Pharm. 2007, 341(1-2), 207-214.
- [174] Mosmann, T.: *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods 1983, 65(1-2), 55-63.
- [175] Michaelis, M., Michaelis, U. R., Fleming, I., Suhan, T., Cinatl, J., Blaheta, R. A., Hoffmann, K., Kotchetkov, R., Busse, R., Nau, H., Cinatl, J., Jr.: *Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo*. Mol Pharmacol 2004, 65(3), 520-527.
- [176] Glauert, A. M. und Glauert, R. H.: *Araldite as an embedding medium for electron microscopy*. J Biophys Biochem Cytol 1958, 4(2), 191-194.
- [177] Reynolds, E. S.: *The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy*. J Cell Biol 1963, 17, 208-212.
- [178] Zenker, D., Begley, D., Bratzke, H., Rubsamen-Waigmann, H., von Briesen, H.: *Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells*. J Physiol 2003, 551(Pt 3), 1023-1032.
- [179] Dodge, J. T., Mitchell, C., Hanahan, D. J.: *The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes*. Arch Biochem Biophys 1963, 100, 119-130.
- [180] Worek, F., Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P.: *Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes*. Biochem Pharmacol 2004, 68(11), 2237-2248.
- [181] Worek, F., Thiermann, H., Szinicz, L.: *Reactivation and aging kinetics of human acetylcholinesterase inhibited by organophosphorylcholines*. Arch Toxicol 2004, 78(4), 212-217.
- [182] Worek, F., Widmann, R., Knopff, O., Szinicz, L.: *Reactivating potency of obidoxime, pralidoxime, HI 6 and HLo 7 in human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by highly toxic organophosphorus compounds*. Arch Toxicol 1998, 72(4), 237-243.
- [183] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., Feather-Stone, R. M.: *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochem Pharmacol 1961, 7, 88-95.
- [184] Aldridge, W. N. und Reiner, E.: *Enzyme inhibitors as substrates - interactions of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids*. 1972, Amsterdam: North-Holland Publishing.
- [185] Su, C. T., Wang, P. H., Liu, R. F., Shih, J. H., Ma, C., Lin, C. H., Liu, C. Y., Wu, M. T.: *Kinetic studies and structure-activity relationships of bispyridinium oximes as reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds*. Fundam Appl Toxicol 1986, 6(3), 506-514.
- [186] Wang, E. I. und Braid, P. E.: *Oxime reactivation of diethylphosphoryl human serum cholinesterase*. J Biol Chem 1967, 242(11), 2683-2687.
- [187] Tokunaga, E., Oki, E., Nishida, K., Koga, T., Egashira, A., Morita, M., Kakeji, Y., Maehara, Y.: *Trastuzumab and breast cancer: developments and current status*. Int. J. Clin. Oncol. 2006, 11(3), 199-208.
- [188] Press, M. F., Cordon-Cardo, C., Slamon, D. J.: *Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues*. Oncogene 1990, 5(7), 953-962.
- [189] Haley, B. und Frenkel, E.: *Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment*. Urol. Oncol. 2008, 26(1), 57-64.
- [190] Chavanpatil, M. D., Khadair, A., Gerard, B., Bachmeier, C., Miller, D. W., Shekhar, M. P., Panyam, J.: *Surfactant-polymer nanoparticles overcome P-glycoprotein-mediated drug efflux*. Mol Pharm 2007, 4(5), 730-738.
- [191] Bender, A., Schfer, V., Steffan, A. M., Royer, C., Kreuter, J., Rubsamen-Waigmann, H., von Briesen, H.: *Inhibition of HIV in vitro by antiviral drug-targeting using nanoparticles*. Res Virol 1994, 145(3-4), 215-220.
- [192] König, K. und Schneckenburger, H.: *Laser-induced autofluorescence for medical diagnosis*. Journal of Fluorescence 1994, 4(1), 17-40.
- [193] Iweibo, I.: *Protein fluorescence and electronic energy transfer in the determination of molecular dimensions and rotational relaxation times of native and coenzyme-bound horse liver alcohol dehydrogenase*. Biochim Biophys Acta 1976, 446(1), 192-205.

- [194] König, K., Berns, M. W., Tromberg, B. J.: *Time-resolved and steady-state fluorescence measurements of beta-nicotinamide adenine dinucleotide-alcohol dehydrogenase complex during UVA exposure*. J Photochem Photobiol B 1997, 37(1-2), 91-95.
- [195] Huang, S., Heikal, A. A., Webb, W. W.: *Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein*. Biophys J 2002, 82(5), 2811-2825.
- [196] Working, P. K., Newman, M. S., Sullivan, T., Yarrington, J.: *Reduction of the cardiotoxicity of doxorubicin in rabbits and dogs by encapsulation in long-circulating, pegylated liposomes*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999, 289(2), 1128-1133.
- [197] Waterhouse, D. N., Tardi, P. G., Mayer, L. D., Bally, M. B.: *A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles*. Drug Saf. 2001, 24(12), 903-920.
- [198] Gabizon, A., Shmeeda, H., Barenholz, Y.: *Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: review of animal and human studies*. Clin. Pharmacokinet. 2003, 42(5), 419-436.
- [199] O'Brien, M. E., Wigler, N., Inbar, M., Rosso, R., Grischke, E., Santoro, A., Catane, R., Kieback, D. G., Tomczak, P., Ackland, S. P., Orlandi, F., Mellars, L., Alland, L., Tendler, C.: *Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer*. Ann. Oncol. 2004, 15(3), 440-449.
- [200] Lasic, D., Martin, F.: *Stealth Liposomes*, in *Handbooks in Pharmacology and Toxicology*, Lasic, D., Martin, F., Editor. 1995, CRC Press: Boca Raton, Florida, U.S. 22-41.
- [201] Gradishar, W. J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P., Hawkins, M., O'Shaughnessy, J.: *Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer*. J. Clin. Oncol. 2005, 23(31), 7794-7803.
- [202] Desai, N., Trieu, V., Yao, Z., Louie, L., Ci, S., Yang, A., Tao, C., De, T., Beals, B., Dykes, D., Noker, P., Yao, R., Labao, E., Hawkins, M., Soon-Shiong, P.: *Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel*. Clin. Cancer Res. 2006, 12(4), 1317-1324.
- [203] Zensi, A., Begley, D., Pontikis, C., Legros, C., Mihoreanu, L., Wagner, S., Buchel, C., von Briesen, H., Kreuter, J.: *Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones*. J Control Release 2009, 137, 78-86.
- [204] Hatters, D. M., Peters-Libeu, C. A., Weisgraber, K. H.: *Apolipoprotein E structure: insights into function*. Trends Biochem Sci 2006, 31(8), 445-454.
- [205] Innerarity, T. L., Pitas, R. E., Mahley, R. W.: *Binding of arginine-rich (E) apoprotein after recombination with phospholipid vesicles to the low density lipoprotein receptors of fibroblasts*. J Biol Chem 1979, 254(10), 4186-4190.
- [206] Herz, J. und Strickland, D. K.: *LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor*. J Clin Invest 2001, 108(6), 779-784.
- [207] Hasadsri, L., Kreuter, J., Hattori, H., Iwasaki, T., George, J. M.: *Functional protein delivery into neurons using polymeric nanoparticles*. J Biol Chem 2009, 284(11), 6972-6981.
- [208] Sauer, I., Dunay, I. R., Weisgraber, K., Bienert, M., Dathe, M.: *An apolipoprotein E-derived peptide mediates uptake of sterically stabilized liposomes into brain capillary endothelial cells*. Biochemistry 2005, 44(6), 2021-2029.
- [209] Sauer, I., Nikolenko, H., Keller, S., Abu Ajaj, K., Bienert, M., Dathe, M.: *Dipalmitoylation of a cellular uptake-mediating apolipoprotein E-derived peptide as a promising modification for stable anchorage in liposomal drug carriers*. Biochim Biophys Acta 2006, 1758(4), 552-561.
- [210] Leupold, E., Nikolenko, H., Beyermann, M., Dathe, M.: *Insight into the role of HSPG in the cellular uptake of apolipoprotein E-derived peptide micelles and liposomes*. Biochim Biophys Acta 2008, 1778(12), 2781-2789.
- [211] Leupold, E., Nikolenko, H., Dathe, M.: *Apolipoprotein E peptide-modified colloidal carriers: the design determines the mechanism of uptake in vascular endothelial cells*. Biochim Biophys Acta 2009, 1788(2), 442-449.
- [212] Gumbleton, M. und Audus, K. L.: *Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier*. J Pharm Sci 2001, 90(11), 1681-1698.
- [213] Omid, Y., Campbell, L., Barar, J., Connell, D., Akhtar, S., Gumbleton, M.: *Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies*. Brain Res 2003, 990(1-2), 95-112.
- [214] Fukushima, H., Fujimoto, M., Ide, M.: *Quantitative detection of blood-brain barrier-associated enzymes in cultured endothelial cells of porcine brain microvessels*. In Vitro Cell Dev Biol 1990, 26(6), 612-620.

Verzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AChE	Acetylcholinesterase
AK	Antikörper
anti-ApoER	Antikörper gegen ApoER
anti-LDLR	Antikörper gegen LDLR
anti-Megalin	Antikörper gegen Megalin
ApoE	Apolipoprotein E
ApoER	Apolipoprotein E-Rezeptor
ASCh	Acetylthiocholin-Iodid
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor (basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovine Serum Albumin (bovines Serumalbumin)
BSE	Backscattered Electron (zurückgestreute Elektronen)
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy (konfokale Raster-Lasermikroskopie)
CPP	Cell Penetrating Peptide (zellpenetrierendes Peptid)
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
d. h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DI17E6	deimmunisierter anti-human $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antikörper
DMF	Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
Dox	Doxorubicin
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylenediamintetraessigsäure)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
EMA	European Medicines Agency (Europäische Arzneimittelagentur)
EPR	Enhanced Permeability and Retention (erhöhte Permeabilität und Retention)
ER	endoplasmatischen Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometer)
FDA	Food and Drug Administration (Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten)
FESEM	Field Emission Scanning Electron Microscope (Feldemissions-Raster-Elektronen-Mikroskop)
FKS	Fötale Kälberserum
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse)
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	hours (Stunden)
H ₂ O	Wasser

HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER	Human Epidermal growth factor Receptor (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HSA	Humanes Serumalbumin
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Ligand
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	Low Density Lipoprotein-Rezeptor
LRP	Low Density Lipoprotein Receptor related Protein (Low Density Lipoprotein-Rezeptor zugehöriges Protein)
LRP1704	Antikörper gegen LRP
mAb	Monoclonal Antibody (monoklonaler Antikörper)
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
MgCl	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	minutes (Minuten)
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	gemeinsame Abkürzung für NADH und NADPH NADH: reduzierte Form von Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, NADPH: reduzierte Form von Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid- Phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCS	Newborn Calf Serum (Neugeborenen Kälberserum)
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NHS-PEG-Mal	Poly(ethylenglykol)-α-Maleinimid-ω-N-Hydroxysuccinimidylester
NP	Nanopartikel
NP ads.	Unmodifizierte Nanopartikel mit zusätzlicher adsorptiver Obidoxim- Beladung
NP-ApoE	Apolipoprotein E-modifizierte HSA-Nanopartikel
NP-ApoE ads.	Apolipoprotein E-modifizierte HSA-Nanopartikel mit zusätzlicher adsorptiver Obidoxim-Beladung
NP-DI17E6	DI17E6-modifizierte HSA-Nanopartikel
NP-Dox-DI17E6	DI17E6-modifizierte Doxorubicin-beladene HSA-Nanopartikel
NP-Dox-IgG	IgG-modifizierte Doxorubicin-beladene HSA-Nanopartikel
NP-Dox-Trastuzumab	Trastuzumab-modifizierte Doxorubicin-beladene HSA-Nanopartikel
NP-Dox-PEG	Unmodifizierte PEGylierte Doxorubicin-beladene HSA-Nanopartikel
NP-IgG	IgG-modifizierte HSA-Nanopartikel
NP-Oxim	Unmodifizierte Obidoxim-beladene HSA-Nanopartikel
NP-Oxim ads.	Unmodifizierte Obidoxim-beladene HSA-Nanopartikel mit zusätzlicher adsorptiver Obidoxim-Beladung
NP-Oxim-ApoE	Apolipoprotein E-modifizierte Obidoxim-beladene HSA-Nanopartikel
NP-Oxim-ApoE ads.	Apolipoprotein E-modifizierte Obidoxim-beladene HSA-Nanopartikel mit zusätzlicher adsorptiver Obidoxim-Beladung
NP-Oxim-PEG	Unmodifizierte PEGylierte Obidoxim-beladene HSA-Nanopartikel
NP-Oxim-PEG ads.	Unmodifizierte PEGylierte Obidoxim-beladene HSA-Nanopartikel mit zusätzlicher adsorptiver Obidoxim-Beladung

NP-PEG	Unmodifizierte PEGylierte HSA-Nanopartikel
NP-PEG ads.	Unmodifizierte PEGylierte HSA-Nanopartikel mit zusätzlicher adsorptiver Obidoxim-Beladung
NP-Trastuzumab	Trastuzumab-modifizierte HSA-Nanopartikel
OP	Organophosphat
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCS	Photon Correlation Spectroscopy (Photonenkorrelationsspektroskopie)
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
R	Rezeptor
RAP	Receptor Associated Protein (Rezeptor-assoziiertes Protein)
RES	retikuloendotheliales System
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SE	Sekundärelektronen
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VN	Vitronektin
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Schematische Strukturen multifunktionaler pharmazeutischer Nanocarrier.	3
Abb.2	„Enhanced Permeability and Retention“ (EPR)-Effekt.	5
Abb.3	Diskutierte Wirkmechanismen von Trastuzumab (Herceptin®).	7
Abb.4	Schematischer Querschnitt durch eine Gehirnapillare.	11
Abb.5	Mögliche Transportwege über die BHS (modifiziert nach Begley et al. [112]).	12
Abb.6	Schematische Darstellung der strukturellen Organisation der verschiedenen Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie (modifiziert nach Hertz und Marschang [143]).	15
Abb.7	Schematische Darstellung der Biosynthese und Sekretion der LDL-Rezeptor-Familie im Zusammenhang mit RAP.	16
Abb.8	Präparation porciner Gehirnapillarendothel-Zellen (pBCEC).	47
Abb.9	Synthese-Schema Doxorubicin-beladener HSA-Nanopartikel mit Antikörper-Modifikation auf der Partikeloberfläche.	54
Abb.10	Spezifische zelluläre Bindung Trastuzumab-modifizierter HSA-Nanopartikel an HER2-überexprimierende Mammakarzinom-Zellen SK-Br-3.	57
Abb.11	Kontrolle der zellulären Bindung Trastuzumab-modifizierter HSA-Nanopartikel an HER2-schwach-exprimierende Mammakarzinom-Zellen MCF-7.	58
Abb.12	Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der Nanopartikel untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie.	59
Abb.13	Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von NP-Dox-Trastuzumab untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie: Aufspaltung der Fluoreszenzkanäle.	60
Abb.14	Doxorubicin-Wiederfindung untersucht mittels Durchflusszytometrie: Unterscheidung unterschiedlicher intrazellulärer Doxorubicin-Konzentrationen und Detektion von nanopartikulär transportiertem Doxorubicin.	62
Abb.15	Doxorubicin-Wiederfindung untersucht mittels Durchflusszytometrie.	63
Abb.16	Doxorubicin-Wiederfindung untersucht mittels Durchflusszytometrie: Intrazelluläre Doxorubicin-Prozessierung.	65
Abb.17	Zellviabilitäts-Assay: Vergleich zwischen NP-Dox-Trastuzumab und NP-Dox-IgG.	67
Abb.18	Zellviabilitäts-Assay: Vergleich zwischen NP-Dox-Trastuzumab und NP-Trastuzumab.	68
Abb.19	Zellviabilitäts-Assay: Vergleich zwischen NP-Dox-Trastuzumab und NP-Dox-IgG.	68
Abb.20	Nachweis der DI17E6-Modifikation auf der Partikeloberfläche mittels Raster-Elektronen-Mikroskopie.	71
Abb.21	Spezifische zelluläre Bindung unbeladener und Doxorubicin-beladener DI17E6-modifizierter Nanopartikel an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positive Melanom-Zellen M21 und Kontrolle der zellulären Bindung an α_v -defekte Melanom-Zellen M21L.	73
Abb.22	Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der Nanopartikel untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie.	74
Abb.23	Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von NP-Dox-DI17E6 untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie: Aufspaltung der Fluoreszenzkanäle.	75
Abb.24	Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von NP-Dox-DI17E6 untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie: Schnittfolge.	76
Abb.25	Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen und von freiem Doxorubicin untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie bei verschiedenen Wellenlängen.	77
Abb.26	Fluoreszenz-Lebenszeit-Analyse.	78
Abb.27	Zell-Attachment-Assay: Verhinderung der Zellanhaftung an Vitronektin-beschichteten Oberflächen.	80

Abb.28	Zell-Detachment-Assay: Ablösen der Zellen von Vitronectin-beschichteten Oberflächen.	80
Abb.29	Spezifische zelluläre Bindung ApoE-modifizierter Nanopartikel.	84
Abb.30	Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der unbeladenen Nanopartikel untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie.	85
Abb.31	Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von NP-ApoE untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie: Schnittfolge.	86
Abb.32	Untersuchungen zur zellulären Aufnahme ApoE-modifizierter Nanopartikel in Maus-Gehirnendothelioma-Zellen bEnd3 mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie.	87
Abb.33	Zellviabilitäts-Assay: Vergleich zwischen NP-ApoE und NP-PEG in verschiedenen Konzentrationen.	88
Abb.34	Zelluläre Bindung der Obidoxim-beladenen Nanopartikel.	92
Abb.35	Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der Obidoxim-beladenen Nanopartikel untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie.	93
Abb.36	Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von NP-Oxim untersucht mittels konfokaler Raster-Lasermikroskopie: Schnittfolge.	94
Abb.37	Zellviabilitäts-Assay: Vergleich zwischen den verschiedenen Obidoxim-beladenen nanopartikulären Formulierungen und freiem Obidoxim.	95
Abb.38	Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands frisch isolierter primärer porciner Gehirnkapillarendothel-Zellen.	96
Abb.39	Biologische Wirksamkeitstestung: Transport- und Freisetzungsstudie der inkorporativ und zusätzlich adsorptiv beladenen Nanopartikel.	98
Abb.40	Biologische Wirksamkeitstestung: Transport- und Freisetzungsstudie der adsorptiv beladenen Nanopartikel.	99

Tabellenverzeichnis

Tab.1	Physikochemische Charakterisierung der Trastuzumab- und IgG-modifizierten Doxorubicin-beladenen HSA-Nanopartikel.	55
Tab.2	Physikochemische Charakterisierung der DI17E6- und IgG-modifizierten unbeladenen HSA-Nanopartikel.	69
Tab.3	Physikochemische Charakterisierung der DI17E6- und IgG-modifizierten Doxorubicin-beladenen HSA-Nanopartikel.	70
Tab.4	Tabellarische Auswertung einer Langzeit-Inkubation der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen.	81
Tab.5	IC ₅₀ -Werte der verschiedenen nanopartikulären Formulierungen.	82
Tab.6	Physikochemische Charakterisierung der ApoE-modifizierten und der PEGylierten HSA-Nanopartikel.	83
Tab.7	Überprüfung des Rezeptorstatus der bEnd3-Zellen.	89
Tab.8	Koinkubation der bEnd3-Zellen mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen und LDL.	89
Tab.9	Koinkubation der bEnd3-Zellen mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen und LDL + RAP.	90
Tab.10	Koinkubation der bEnd3-Zellen mit den verschiedenen nanopartikulären Formulierungen und LRP Dom II bzw. LRP Dom IV.	90
Tab.11	Physikochemische Charakterisierung der inkorporativ beladenen ApoE-modifizierten, PEGylierten und unmodifizierten HSA-Nanopartikel.	91

Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

ANHORN, M. G.*, **WAGNER, S***, KREUTER, J., LANGER, K., VON BRIESEN, H.: „Specific targeting of HER2 overexpressing breast cancer cells with doxorubicin loaded trastuzumab modified human serum albumin nanoparticles“. Bioconjugate Chemistry 2008, 19(12), 2321 - 31

* gleichberechtigte Autorenschaft

WAGNER, S., ROTHWEILER, F., ANHORN, M. G., SAUER, D., RIEMANN, I., WEISS, E. C., KATSEN-GLOBA, A., MICHAELIS, M., SCHWARTZ, D., KREUTER, J., VON BRIESEN, H., LANGER, K.: „Enhanced Drug Targeting by Attachment of an Anti α -Integrin Antibody on Doxorubicin Loaded Human Serum Albumin Nanoparticles“. Biomaterials 2010, 31, 2388-2398

ZENSI, A., BEGLEY, D., PONTIKIS, C., LEGROS, C., MIHOREANU, L., **WAGNER, S.**, BÜCHEL, C., VON BRIESEN, H., KREUTER, J.: „Apolipoprotein E enables brain uptake of nanoparticles by transcytosis“. Journal of Controlled Release 2009, 137, 78 - 86

FOURNELLE, M., BOST, W., **WAGNER, S.**, STRACKE, F., LEMOR, R.: „Contrast enhanced optoacoustics for molecular imaging“. Proceedings of NAG/DAGA 2009

KUFLEITNER, J., **WAGNER, S.**, WOREK, F., VON BRIESEN, H., KREUTER, J.: „Adsorption of obidoxime onto human serum albumin nanoparticles: Loading capacity, particle size and drug release“. Journal of Microencapsulation, in press

ZHENG, S., LÖW K., WACKER, M., WIEHE, A., **WAGNER, S.**, LANGER, K., VON BRIESEN, H., ZOU, S.: „Interaction and cytotoxicity of mTHPC and mTHPC complexes in T cell lymphoma cells“. eingereicht beim Chinese Journal of Experimental Surgery

ZHENG, S., LÖW, K., **WAGNER, S.**, VON BRIESEN, H., YANG, X., ZOU, S.: „Cytotoxicity of Triptolide and Triptolide loaded polymeric micelles in vitro“. eingereicht bei Toxicology in vitro

WAGNER, S., KUFLEITNER, J., WIEN, S., BUNGERT, J., VOGEL, T., WOREK, F., KREUTER, J., VON BRIESEN, H.: „Nanoparticulate transport of obidoxime over the blood-brain barrier“. in Vorbereitung

ROTHWEILER, F., HOLZER, M., VOGEL, V., **WAGNER, S.**, VON BRIESEN, H., MÄNTELE, W., SCHWARTZ, D., MICHAELIS, M., CINATL JR., J., KREUTER, J., LANGER, K.: „Activity of an integrin-antibody is maintained after embedding in PLGA-nanoparticles“. in Vorbereitung

Kongressbeiträge

Vorträge

WAGNER, S.: „Präklinische Testung nanopartikulärer Arzneistoffsysteme zur gezielten Tumorthherapie“. Vortrag anlässlich des CC-NanoChem-Workshops Nanotechnologie im Bereich Life Science in Berlin (Berlin), 2006

WAGNER, S., VON BRIESEN, H.: „Präklinische Testung nanopartikulärer Systeme für die Krebstherapie“. Vortrag anlässlich der Summer School Chemische Nanotechnologie in Saarbrücken (Saarland), 2007

WAGNER, S., ZENSI, A., BUNGERT, J., WIEN, S., KREUTER, VON BRIESEN, H.: „Isolation and characterization of primary porcine brain capillary endothelial cells and binding studies of Apolipoprotein E Loaded human serum albumin nanoparticles“. Abstract + Vortrag anlässlich des 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology in Barcelona (Spanien), 2008

WAGNER, S., VON BRIESEN, H.: „Zellkultur-Untersuchungen zur Aufnahme von ApoE-modifizierten HSA-Nanopartikeln in verschiedene Endothelzellen“. Vortrag anlässlich des 10. Treffen der Blut-Hirn Schranke-Experten und Caco-2 Anwender in Bad Herrenalb (Baden Württemberg), 2008

KUFLEITNER, J., WAGNER, S., VON BRIESEN, H., KREUTER, J.: „Development of Nanoparticles as Carriers for the Brain Delivery of Oximes“. Abstract + Vortrag, anlässlich der 11. Medizinischen C-Schutz Tagung in München (Bayern), 2008

ZENSI, A., BEGLEY, D., PONTIKIS, C., LEGROS, C., MIHOREANU, L., **WAGNER, S.,** BÜCHEL, C., VON BRIESEN, H., KREUTER, J.: „Transcytosis of ApoE-modified Albumin Nanoparticles across the BBB and into the Brain“. Abstract + Vortrag anlässlich BRAINS for BRAIN, European Task Force on Brain and Neurodegenerative Lysosomal Storage Diseases, Third European Workshop in Frankfurt (Hessen), 2009

FOURNELLE, M., WAGNER, S., STRACKE, F., FONFARA, H., WELSCH, H.-J., LEMOR, R.: „Gold Nanoparticles for molecular imaging based on contrast enhanced optoacoustics“. Abstract + Vortrag anlässlich Nanobio-Europe in Grenoble (Frankreich), 2009

BOST, W., FOURNELLE, M., KOHL, Y., STRACKE, F., **WAGNER, S.,** LEMOR, R.: „Optoacoustic molecular imaging from microscopic to macroscopic“. Abstract + Vortrag anlässlich Nanotech in Berlin (Berlin), 2009

Poster

WAGNER, S., EHLERS, A., SAUER, D., KÖNIG, K., VON BRIESEN, H.: „Confocal Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging of a Nanoparticulate Drug Targeting Formulation“. Poster anlässlich des Workshop on Advanced Multiphoton and Fluorescence Lifetime Imaging Techniques in St. Ingbert (Saarland), 2007

WAGNER, S., KUFLEITNER, J., KREUTER, J., VON BRIESEN, H.: „Development and cell culture testing of Nanoparticles for the Brain Delivery of Oximes“. Abstract + Poster, anlässlich der 11. Medizinischen C-Schutz Tagung in München (Bayern), 2008

WAGNER, S., ANHORN, M.G., KREUTER, J., LANGER, K., VON BRIESEN, H.: „Specific Targeting of Cancer Cells with Doxorubicin-Loaded Nanoparticles“. Abstract + Poster anlässlich des CRS 36th Annual Meeting & Exposition in Kopenhagen (Dänemark), 2009

WAGNER, S., ZENSI, A., BEGLEY, D., KREUTER, J., VON BRIESEN, H.: „Transport of Apolipoprotein E-modified Nanoparticles over the Blood Brain Barrier“. Abstract + Poster anlässlich des Blut-Hirn-Schranke-Treffen in Strasbourg (Frankreich), 2009

WAGNER, S.*, KUFLEITNER, J.*, KREUTER, J., VON BRIESEN, H.: „Nanoparticles for the transport of oximes over the blood brain barrier: Synthesis and release studies“. Abstract + Poster anlässlich der C-Schutz-Tagung in München (Bayern), 2009

*** gleichberechtigte Autorenschaft**

HOLZER, M., ANHORN, M., LANGER, K., KREUTER, J., VOGEL, V., MÄNTELE, W., ROTHWEILER, F., MICHAELIS, M., **WAGNER, S.**, VON BRIESEN, H., HINDEL, S., SCHWARTZ, D.: „Nanopartikuläre Arzneistoffsysteme für die gezielte Tumorthherapie“. Poster anlässlich des 2. BMBF Symposiums Nanobiotechnologie in Hannover (Niedersachsen), 2005

LANGER, K., HOLZER, M., ANHORN, M., VOGEL, V., MÄNTELE, W., ROTHWEILER, F., MICHAELIS, M., **WAGNER, S.**, VON BRIESEN, H., HINDEL, S., SCHWARTZ, D.: „Nanopartikuläre Arzneistoffsysteme für die gezielte Tumorthherapie (NanoDrug)“. Poster anlässlich des 3. BMBF-Symposiums Nanobiotechnologie in Hannover (Niedersachsen), 2007

ZENSI, A., **WAGNER, S.**, BÜCHEL, C., VON BRIESEN, H., KREUTER, J.: „Electron Microscopy of the Uptake of Apolipoprotein E Loaded Human Serum Albumin Nanoparticles into Mouse Endothelioma Cells“. Abstract + Poster anlässlich des 6th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology in Barcelona (Spanien), 2008

ZENSI, A., **WAGNER, S.**, BÜCHEL, C., VON BRIESEN, H., KREUTER, J.: „Investigating the uptake of Apolipoprotein-modified nanoparticles into brain endothelial cells“. Abstract + Poster anlässlich des GPEN-Kongress in Leuven (Belgien), 2008

ZENSI, A., **WAGNER, S.**, BÜCHEL, C., VON BRIESEN, H., KREUTER, J.: „Electron Microscopy of the Uptake of Apolipoprotein E Loaded Human Serum Albumin Nanoparticles into Mouse Endothelioma Cells“. Poster anlässlich der NanoSolutions 2008 in Frankfurt (Hessen), 2008

LÖW, K., REUM, N., **WAGNER, S.**, SCHNEIDER, M., VON BRIESEN, H.: „Cytotoxicity and cellular accumulation of gold nanoparticles in human colon carcinoma cells”. Abstract + Poster anlässlich der Konferenz „Gold 2009“ in Heidelberg (Baden-Württemberg), 2009

LÖW, K., WACKER M., **WAGNER, S.**, LANGER, K., VON BRIESEN, H.: „Targeted HSA-nanoparticles accumulation in different colon carcinoma cell lines using EGFR-expression”. Abstract + Poster anlässlich des 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology in Malta (Malta), 2010

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sylvia Wagner
Anschrift	Kleiner Hirschberg 1 66539 Neunkirchen
geboren am	08.12.1977 in St. Wendel
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1984 - 1988	Grund- und Hauptschule St. Anna in St. Wendel
1988 - 1997	Gymnasium Wendalinum in St. Wendel

Hochschulausbildung

1997 - 2003	Studium der Chemie an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe Abschluss mit Diplom Experimentelle Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Hartwig am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Fridericiana zu Karlsruhe mit dem Thema <i>Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies in Zellen: Etablierung eines Testsystems und Einfluss von Arsenverbindungen</i>
2003 - 2004	Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Rossmanith an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe mit dem Thema <i>Vergleich der Genexpression in menschlichen Plazenten aus gesunden und pathologischen Schwangerschaften</i> (Schließung der Arbeitsgruppe aus finanziellen Gründen)
seit 12/04	Doktorand in der Abteilung Zellbiologie und angewandte Virologie von PD Dr. H. v. Briesen am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert mit dem Thema <i>Präklinische Testung nanopartikulärer Arzneistoffsysteme auf Basis von humanem Serumalbumin zum gezielten Wirkstofftransport</i>

Berufliche Tätigkeiten

seit 12/04	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert
seit 10/08	Arbeitsgruppenleiter „Präklinische Nanobiotechnologie“ am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert
